

**Ganzgenom-basierte Analysen
multiresistenter *Klebsiella pneumoniae*-Isolate aus Deutschland**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Laura Antonia Becker, geb. Busch
aus Bonn

1. Referent:

2. Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

Prof. Dr. Ulrich Nübel

Prof. Dr. Michael Steinert

20.02.2018

26.06.2018

Druckjahr 2018

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Laura Becker, Stephan Fuchs, Yvonne Pfeifer, Torsten Semmler, Tim Eckmanns, Gerit Korr, Hans-Peter Blank, Dagmar Sissolak, Michael Friedrichs, Edith Zill, Mei-Lin Tung, Christian Dohle, Martin Kaase, Sören Gatermann, Holger Rüßmann, Matthias Steglich, Sebastian Haller, Guido Werner

Whole genome sequence analysis of CTX-M-15 producing Klebsiella isolates allowed dissecting a polyclonal outbreak scenario

Frontiers in Microbiology, in Revision

Laura Becker, Matthias Steglich, Stephan Fuchs, Guido Werner, Ulrich Nübel

Comparison of six commercial kits to extract bacterial chromosome and plasmid DNA for MiSeq sequencing

Scientific Reports, 2016, DOI: 10.1038/srep28063

Laura Becker, Boyke Bunk, Christoph Eller, Matthias Steglich, Yvonne Pfeifer, Guido Werner, Ulrich Nübel

Complete genome sequence of a CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae outbreak strain from multilocus sequence type 514.

Genome Announcements, 2015, DOI: 10.1128/genomeA.00742-15

Vorträge

Laura Becker, Stephan Fuchs, Yvonne Pfeifer, Jennifer Bender, Torsten Semmler, Martin Kaase, Sören Gatermann, Dagmar Sissolak, Christian Dohle, Dirk Werber, Holger Rüßmann, Gerit Korr, Sebastian Haller, Tim Eckmanns, Guido Werner

WGS-based analysis of a cluster of CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae in a neurorehabilitation centre

68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Ulm, 2016

Laura Becker, Matthias Steglich, Yvonne Pfeifer, Martin Kaase, Stephan Fuchs, Guido Werner

Genomic diversity of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Germany

ESCMID-ESGEM CONFERENCE – IMMEX XI, Estoril, Portugal, 2016

Laura Becker, Matthias Steglich, Christoph Eller, Yvonne Pfeifer, Guido Werner, Boyke Bunk, Ulrich Nübel

Comparison of six commercial kits to extract bacterial chromosomal and plasmid DNA for MiSeq sequencing

67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Münster, 2015

Poster

Laura Busch, Matthias Steglich, Yvonne Pfeifer, Franziska Layer, Guido Werner, Ulrich Nübel

Genomic diversity of KPC-2/3 and OXA-48 carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Germany

4. Gemeinsame Konferenz von DGHM und VAAM, VAAM-Jahrestagung 2014, 66. Jahrestagung der DGHM, Dresden, 2014

Multiresistente *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) spielen weltweit eine wichtige Rolle als Verursacher nosokomialer Infektionen. Die vorliegende Doktorarbeit widmet sich der Ganzgenom-basierten Analyse ESBL- und Carbapenemase-produzierender *K. pneumoniae*-Isolate aus Deutschland und gliedert sich in vier Projekte.

Ziel des ersten Projekts war die Rekonstruktion der Genomsequenz eines CTX-M-15-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolats (234/12) des Sequenztyps ST514. Durch Kombination von PacBio- und Illumina Miseq-Sequenzierung konnte nicht nur die Sequenz des Chromosoms, sondern auch die Sequenz der drei Plasmide (3,8 kb, 4,8 kb und 362 kb) rekonstruiert werden.

Das Isolat 234/12 wurde im zweiten Schritt verwendet, um den Einfluss des DNA-Extraktionskits auf die anschließende Miseq-Sequenzierung zu untersuchen. Dafür wurden sechs kommerziell erhältliche DNA-Extraktionskits verglichen. Während die Wahl des Kits kaum Einfluss auf die Qualität der Sequenzierung (*Read*- und *Insert*-Länge, Q20/Q30-Werte) und die *Sequencing Coverage* von Chromosom und 362 kb-Plasmid hatte, fiel die *Coverage* der zwei kleinen Plasmide bei Verwendung von *salting-out*-basierten Kits wesentlich geringer aus als mit Matrix-basierten Kits. Da jedoch mit allen getesteten Kits eine ausreichende *Coverage* aller Replikons erreicht wurde, kann die Wahl des Kits in Fällen, in denen die beobachteten Unterschiede in der *Coverage* kleiner Plasmide (<5 kb) vernachlässigbar sind, von anderen Faktoren (Kosten, Zeitaufwand, Potential zur Automatisierung) abhängig gemacht werden.

Das dritte Teilprojekt widmete sich der umfassenden Beschreibung der Population Carbapenemase-produzierender *K. pneumoniae* (KPC-2, KPC-3, OXA-48, NDM-1) in Deutschland. Dazu wurde das Genom von insgesamt 107 Isolaten aus den Jahren 2008 bis 2014 sequenziert (Illumina Miseq). Die Sequenzdaten wurden zur Berechnung von *Maximum-Likelihood*-Bäumen, auch unter Einbeziehung internationaler *K. pneumoniae*-Isolate, und zur Charakterisierung der Isolate hinsichtlich ihres Sequenz- und Kapseltyps (*wzi*-Typisierung) sowie ihres Gehalts an Plasmiden, Beta-Laktamase- und Virulenzgenen verwendet. Neben erfolgreichen klonalen Linien, wie ST258/ST512, ST101, ST147, ST395 und ST15, auf die die Mehrzahl der untersuchten Isolate entfiel, zeigten sich auch Isolate, deren Sequenztypen bisher nur selten in Assoziation mit Carbapenemasen beschrieben wurden, wie zwei *K. variicola*-Isolate (ST347, ST906) und ein OXA-48-produzierendes ST23-Isolat mit einem hohen Gehalt an Virulenzfaktoren.

Die Untersuchung eines Ausbruchsgeschehens, das sich ab April 2015 bis Mai 2016 in einer deutschen Klinik ereignete, bildete das vierte Teilprojekt. Die Ganzgenom-basierte Analyse von 53 Isolaten zeigte das Vorliegen von insgesamt drei Ausbruchsklustern. Cluster 1 und 2 wurden von *K. pneumoniae*-Isolaten der Sequenztypen ST15 (n = 31) bzw. ST405 (n = 7) gebildet, während das dritte Cluster der Spezies *K. quasipneumoniae* zugeordnet werden konnte (ST414, n = 8). Zur schnellen Identifizierung weiterer Ausbruchs isolate wurde eine für das Hauptcluster spezifische Triplex-PCR etabliert. Außerdem wurden die Ganzgenom-Daten genutzt, um die genetische Ursache für die Carbapenem- bzw. Colistinresistenz von zwei Isolaten des ST15-Clusters zu bestimmen.

VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION	I
ZUSAMMENFASSUNG	III
INHALTSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
1.1.1 Taxonomie	1
1.1.2 Typisierung von <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten	2
1.1.2.1 Kapseltypisierung	2
1.1.2.2 <i>Multi-Locus-Sequence-Typing</i>	2
1.1.2.3 Pulsfeld-Gel-Elektrophorese	3
1.1.2.4 Plasmidtypisierung	3
1.1.2.5 Besitz von Virulenzfaktoren	4
1.2 Antibiotikaresistenzen in <i>K. pneumoniae</i>	5
1.2.1 Beta-Laktam-Antibiotika	6
1.2.1.1 Wirkweise und Resistenz	6
1.2.1.2 Klassifizierung von Beta-Laktamasen	7
1.2.1.3 <i>Extended spectrum</i> -Beta-Laktamasen und Carbapenemasen	7
1.2.2 Polymyxin-Antibiotika	9
1.3 Die Populationsstruktur von <i>K. pneumoniae</i>	10
1.4 Die Bedeutung multiresistenter <i>K. pneumoniae</i> in Deutschland	11
1.4.1 Ausbrüche verursacht durch multiresistente <i>K. pneumoniae</i> in Deutschland	13
1.5 Ganzgenom-Sequenzierung in der mikrobiologischen Forschung	14
1.5.1 Prinzip der PacBio-Sequenzierung	15
1.5.2 Prinzip der Illumina-Sequenzierung	15
1.5.3 Extraktion bakterieller DNA für die Ganzgenom-Sequenzierung	16
1.6 Zielsetzung der Arbeit	17
2 MATERIAL & METHODEN	19
2.1 Material	19
2.1.1 Kits	19
2.1.2 Kulturmedien und Agarplatten	19
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.4 Enzyme	20
2.1.5 Geräte	21
2.1.6 Puffer	21
2.1.7 Software	22
2.1.8 Primer	23
2.2 Molekular- und mikrobiologische Methoden	28
2.2.1 Herkunft der Isolate	28
2.2.1.1 <i>K. pneumoniae</i> 234/12	28
2.2.1.2 Carbapenemase-produzierende <i>Klebsiella</i> -Isolate aus Deutschland	28
2.2.1.3 ESBL-produzierende <i>Klebsiella</i> -Isolate aus einem Ausbruchsgeschehen	28
2.2.2 Kultivierung von <i>K. pneumoniae</i>	28
2.2.2.1 Agarplatten	28
2.2.2.2 Cryokulturen	28
2.2.2.3 Kultivierung von <i>K. pneumoniae</i> als Flüssigkultur	29

2.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl	29
2.2.3 Extraktion bakterieller DNA	29
2.2.3.1 Koch-DNA	29
2.2.3.2 DNeasy Blood & Tissue Kit	29
2.2.3.3 MagAttract HMW DNA Kit	30
2.2.3.4 MasterPure DNA Purification Kit	30
2.2.3.5 Wizard Genomic DNA Purification Kit	30
2.2.3.6 Plasmid Mini Kit	30
2.2.3.7 Genomic-tip 20/G	30
2.2.3.8 QIAfilter Plasmid Midi Kit	30
2.2.4 Bestimmung von Konzentration und Reinheit der extrahierten DNA	30
2.2.4.1 Photometrische Messung unter Verwendung des BioPhotometers	31
2.2.4.2 Fluorometrische Messung unter Verwendung des Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kits	31
2.2.4.3 Fluorometrische Messung unter Verwendung des Qubit ds DNA HS Assay Kits	31
2.2.5 Miseq-Sequenzierung	31
2.2.5.1 Nextera XT Library Präparation	31
2.2.5.2 Qualitätskontrolle der Libraries	32
2.2.5.3 Laden der Proben und Sequenzierung	32
2.2.6 Puls-Feld-Gelelektrophorese	32
2.2.6.1 Herstellung der Agaroseblöckchen	32
2.2.6.2 Verdau der bakteriellen DNA	33
2.2.6.3 Laufparameter	34
2.2.6.4 PFGE mit Flüssigproben	34
2.2.6.5 PFGE der Ausbruchs isolate	34
2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion	35
2.2.7.1 Einsatz von PCRs zur Typisierung	35
2.2.7.2 Mutationsanalyse von Resistenz-relevanten Genen	36
2.2.7.3 Überprüfung des Ringschlusses des 3,8 kb- und des 4,8 kb-Plasmids	36
2.2.7.4 Cluster 1-spezifische Multiplex-PCR	36
2.2.7.5 Sanger-Sequenzierung	36
2.2.7.6 Quantitative <i>real time</i> PCR zur Bestimmung der Plasmid-Kopiezahl	37
2.2.8 Phänotypische Resistenztestung	37
2.2.8.1 Bestimmung der Resistenz mittels Etest	37
2.2.8.2 Resistenztestung unter Verwendung des Vitek 2-Systems	38
2.2.9 Restriktionsverdau zur Bestätigung der Sequenzen des 3,8 kb- und des 4,8 kb-Plasmids	38
2.3 Bioinformatische Methoden	39
2.3.1 Verfügbarkeit der Rohdaten	39
2.3.2 Verarbeitung von Illumina-Sequenzdaten	39
2.3.2.1 Trimming der Illumina- <i>Reads</i>	39
2.3.2.2 Mapping der Illumina- <i>Reads</i> und Consensus-Bildung	40
2.3.2.3 <i>De novo</i> -Assembly	41
2.3.3 Typisierung ausgehend von Ganzgenom-Daten	41
2.3.4 Genomrekonstruktion aus Ganzgenom-Daten	42
2.3.4.1 Rekonstruktion der Sequenzen des 3,8 kb- und des 4,8 kb-Plasmids des <i>K. pneumoniae</i> -Isolats 234/12	42
2.3.4.2 Rekonstruktion der Sequenzen der kleinen Plasmide des Cluster 1-Ausbruchsstamms	43
2.3.4.3 Rekonstruktion der Genomsequenz des Isolats 234/12	43
2.3.5 Phylogenetische Analysen	44
2.3.5.1 Identifizierung eines geeigneten Referenzgenoms	44
2.3.5.2 Identifizierung repetitiver Bereiche	44

2.3.5.3 Filtern von SNPs	44
2.3.5.4 Berechnung von <i>Maximum-Likelihood</i> -Bäumen	45
2.3.5.5 Erstellen artifizierter <i>Reads</i>	45
2.3.6 Cluster 1-spezifische Multiplex-PCR – Primerdesign	46
3 ERGEBNISSE	47
3.1 Rekonstruktion der Genomsequenz und Charakterisierung des <i>K. pneumoniae</i>-Isolats 234/12	47
3.1.1 Hintergrund	47
3.1.2 Rekonstruktion der Genomsequenz	47
3.1.3 Gehalt an Antibiotika-Resistenzgenen	49
3.1.4 Replikontypen der Plasmide	49
3.1.5 Gehalt an Virulenzgenen	50
3.2 Vergleich von DNA-Extraktionskits zur Extraktion von bakterieller DNA für die Miseq-Sequenzierung	51
3.2.1 Hintergrund	51
3.2.2 Eigenschaften der DNA-Extraktionskits	51
3.2.3 Einfluss des Extraktionskits auf die Qualität der DNA	53
3.2.4 Einfluss der Extraktionskits auf Qualität der <i>Libraries</i>	54
3.2.5 Einfluss des DNA-Extraktionskits auf die <i>Coverage</i> von Chromosom und Plasmiden	55
3.2.6 <i>Coverage</i> entlang der Replikons	56
3.2.7 Bestimmung der Plasmidkopiezahl über qPCR und <i>Coverage</i>	57
3.3 Genomische Diversität Carbapenemase-produzierender <i>K. pneumoniae</i> in Deutschland	59
3.3.1 Hintergrund und Auswahl der Isolate	59
3.3.2 MLST-Typisierung	60
3.3.3 Gehalt an Beta-Laktamase-Genen	61
3.3.4 Besitz von Virulenzgenen	62
3.3.5 <i>wzi</i> -Gen-Typisierung	63
3.3.6 Plasmidgehalt – Nachweis von Inc-Gruppen	65
3.3.7 Identifizierung der <i>K. variicola</i> -Isolate	66
3.3.8 Phylogenie der Carbapenemase-produzierenden <i>K. pneumoniae</i> -Isolate	66
3.3.9 Einordnung der Carbapenemase-produzierenden Isolate in die internationale <i>K. pneumoniae</i> -Population	69
3.3.9.1 Vergleich der ST258/ST512-Isolate	71
3.4 Analyse CTX-M-15-produzierender <i>Klebsiella</i>-Isolate aus einem Ausbruchsgeschehen	73
3.4.1 Hintergrund	73
3.4.2 Phylogenetische Analyse der Ausbruchs isolate	73
3.4.3 Entwicklung einer Cluster 1-spezifischen PCR	75
3.4.4 Analyse des Resistenzprofils	76
3.4.5 Untersuchung des Plasmidgehalts	77
3.4.6 Analysen zur Lokalisation des <i>bla</i> _{CTX-M-15} -Gens	79
4 DISKUSSION	82
4.1 Rekonstruktion der Ganzgenom-Sequenz des Isolats 234/12	82
4.2 Vergleich sechs verschiedener DNA-Extraktionskits zur Isolierung bakterieller DNA für die anschließenden Miseq-Sequenzierung	84
4.3 Genomische Diversität Carbapenemase-produzierender <i>K. pneumoniae</i> in Deutschland	87

4.4 Analyse CTX-M-15-produzierender <i>Klebsiella</i>-Isolate aus einem Ausbruchsgeschehen	98
5 LITERATUR	107
ANHANG	XIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XXXVII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XXXVIII
TABELLENVERZEICHNIS	XXXIX
DANKSAGUNG	XL

1 Einleitung

1.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) ist ein gramnegatives, nicht bewegliches, bekapseltes Bakterium und gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Es findet sich in der Umwelt, z. B. im Boden und in Gewässern, und als Besiedler von Säugetieren. Beim Menschen tritt *K. pneumoniae* als Besiedler des Nasenrachenraums und des Gastrointestinaltrakts auf (Podschun and Ullmann, 1998). *K. pneumoniae* spielt weltweit eine wichtige Rolle als Verursacher nosokomialer und ambulant erworbener Infektionen. Die Krankheitsbilder reichen von Harnwegsinfektionen, Leberabzessen, Lungen- und Hirnhautentzündungen bis hin zur Sepsis (Paczosa and Meccas, 2016).

1.1.1 Taxonomie

Phylogenetische Analysen von zuvor als *K. pneumoniae* identifizierten Isolaten zeigten das Vorkommen von insgesamt drei Phylogruppen (KpI, KpII und KpIII) (Brisse and Verhoef, 2001; Brisse et al., 2004a). Diese Phylogruppen wurden später als eigenständige Spezies klassifiziert (*K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* und *K. variicola*) (Brisse et al., 2014; Rosenblueth et al., 2004). Die Bezeichnung *K. pneumoniae* schließt folglich nur die Vertreter der Phylogruppe KpI mit ein. Für eine eindeutige Definition werden daher auch die Bezeichnungen *K. pneumoniae sensu stricto* (als Bezeichnung für die Spezies *K. pneumoniae*) und *K. pneumoniae sensu lato* (als Bezeichnung für die drei Phylogruppen bzw. Spezies) verwendet. Die Spezies *K. pneumoniae* umfasst neben *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* zwei weitere Subspezies, nämlich *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* und *K. pneumoniae* subsp. *ozeanae* (Brisse and Verhoef, 2001; Brisse et al., 2009), wobei diese mit spezifischen Krankheitsbildern assoziiert sind. So verursacht *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* hauptsächlich Infektionen der oberen Atemwege, die sich in Form eines Rhinoskleroms zeigen (Hart and Rao, 2000), während *K. pneumoniae* subsp. *ozeanae* als Verursacher einer primären Rhinitis atrophicans auftritt (Chand and MacArthur, 1997). Die Spezies *K. quasipneumoniae* umfasst nach heutigem Stand die zwei Subspezies *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* und *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Brisse et al., 2014).

Eine phänotypische Unterscheidung der drei Spezies *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* und *K. variicola* ist nicht möglich. Allerdings lassen sie sich durch genotypische Analysen voneinander abgrenzen. So bieten die Sequenzanalyse oder der Restriktionsverdau des *gyrA* bzw. des *parC*-Gens und die Bestimmung des chromosomalen Beta-Laktamase-Gens eine Möglichkeit zur Differenzierung (Brisse and Verhoef, 2001; Brisse et al., 2004a; Fonseca et al., 2017). Vertreter der Spezies *K. pneumoniae* weisen das chromosomale Beta-Laktamase-Gen *bla_{SHV}* auf, wohingegen *K. quasipneumoniae* mit dem Gen *bla_{OKP}* und *K. variicola* mit dem Gen *bla_{LEN}* assoziiert sind (Hægman

et al., 2004). Kürzlich wurde jedoch ein *K. variicola*-Isolat entdeckt, das statt des erwarteten *bla*_{LEN}-Gens ein *bla*_{OKP}-Gen besaß (Long et al., 2017), sodass der alleinige Nachweis dieser Beta-Laktamase-Gene für eine eindeutige Identifizierung nicht ausreicht.

1.1.2 Typisierung von *K. pneumoniae*-Isolaten

K. pneumoniae-Isolate lassen sich sowohl durch phänotypische, als auch durch genotypische Methoden charakterisieren. Heutzutage überwiegt die Genom-basierte Analyse und Eigenschaften, wie z.B. der Kapseltyp, der in der Vergangenheit durch aufwendige Experimente bestimmt wurde, lassen sich aus den Ganzgenom-Daten ableiten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden klinische *K. pneumoniae*-Isolate hinsichtlich ihres Kapsel- und Sequenztyps, ihres Gehalts an Plasmiden und Virulenzgenen und z.T. auch mittels Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE) charakterisiert.

1.1.2.1 Kapseltypisierung

Die aus Polysacchariden bestehende Kapsel ist der bestcharakterisierte Virulenzfaktor von *K. pneumoniae* (Paczosa and Mecsas, 2016). Ursprünglich wurde der Kapseltyp (K-Typ) über Serotypie bestimmt. Diese Methode ist jedoch relativ zeitaufwändig und das Ergebnis ist nicht immer eindeutig. Zudem sind die benötigten Antisera nicht kommerziell erhältlich und die Durchführung ist somit nicht in jedem Labor möglich (Podschun and Ullmann, 1998). Als Alternative zur Antiserum-basierten Typisierung wurden daher verschiedene genotypische Methoden entwickelt. Die für die Ausbildung der Kapsel verantwortlichen Gene werden von dem chromosomal vorliegenden *capsule polysaccharide synthesis (cps)*-Gencluster codiert. Bei der *cps* PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*)-Analyse werden die Gene des *cps*-Clusters per PCR amplifiziert und das Produkt anschließend mit dem Restriktionsenzym HincII verdaut. Zur Bestimmung des Kapseltyps wird das sich bei Auftrennung im Agarosegel ergebene Muster (*C pattern*) mit den Profilen bekannter Kapseltypen abgeglichen (Brisse et al., 2004b). Die beiden anderen Methoden basieren auf der Sequenzanalyse jeweils eines Gens des *cps*-Clusters. Bei der Typisierung anhand des *wzi*-Gens sind den verschiedenen Kapseltypen einzelne *wzi*-Allele zugeordnet (Brisse et al., 2013), während bei der *wzc*-Typisierung die Zuordnung des K-Typs anhand der Nukleotidähnlichkeit zum Referenzallel erfolgt (Grenzwert 94 %) (Pan et al., 2013). Erst kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, in der eine Methode zur Typisierung basierend auf der Sequenz des gesamten *cps*-Genclusters (K-Locus) vorgestellt wird (Wyres et al., 2016). Dabei erfolgt die Analyse ausgehend von Ganzgenom-Daten mithilfe eines Software-Tools.

1.1.2.2 Multi-Locus-Sequence-Typing

Multi-Locus-Sequence-Typing (MLST) bezeichnet die Typisierung von Bakterien basierend auf der Sequenz mehrerer *Housekeeping*-Gene. Aus der Kombination der Allele ergibt sich der Sequenztyp

(ST). Das MLST-Schema für *K. pneumoniae* wurde im Jahr 2005 veröffentlicht und berücksichtigt Bereiche der folgenden sieben *Housekeeping*-Gene: *rpoB* (Beta-Untereinheit der RNA-Polymerase), *gapA* (Glycerinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase), *mdh* (Malat-Dehydrogenase), *pgi* (Phosphoglucose-Isomerase), *phoE* (Phosphorin E), *infB* (Translationsinitiationsfaktor 2) und *tonB* (*Periplasmic energy transducer*) (Diancourt et al., 2005). Seither wurden fast 3000 verschiedene Sequenztypen in der MLST-Datenbank hinterlegt (*Klebsiella* PasteurMLST *sequence definition database*, <http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

1.1.2.3 Pulsfeld-Gel-Elektrophorese

Die PFGE ermöglicht das Auftrennen sehr großer DNA-Fragmente (bis zu 12 Megabasen) (Herschleb et al. 2007). Erreicht wird dies durch zwei im Wechsel und in verschiedenen Richtungen angelegte Spannungsfelder. Die Zeit, die benötigt wird, um sich entlang der Achse des neuen Spannungsfelds zu orientieren, hängt von der Größe des DNA-Moleküls ab. Folglich können DNA-Fragmente, deren Reorientierungszeit kürzer ist als die Dauer des elektrischen Pulses größenabhängig aufgetrennt werden (Herschleb et al., 2007).

In der molekularen Epidemiologie wird die PFGE eingesetzt, um zu untersuchen, ob bakterielle Isolate, die in einem epidemiologischen Zusammenhang stehen, genetisch verwandt sind (Goering, 2010). Dafür wird bakterielle DNA, die zuvor mit einem Restriktionsenzym (XbaI bei *K. pneumoniae*) verdaut wurde, im Pulsfeld-Gel aufgetrennt. Aus dem Vergleich der Bandenmuster können Rückschlüsse auf die Verwandtschaft der analysierten Isolate gezogen werden. Unterschiede zwischen Isolaten werden nur abgebildet, wenn sie den Verlust oder die Entstehung einer Schnittstelle zur Folge haben oder den Abstand zwischen Schnittstellen verändern (Tenover et al., 1995). So können insbesondere Unterschiede zwischen Isolaten hoch klonaler Linien in der PFGE oft nicht aufgelöst werden (Goering, 2010).

Eine weitere Anwendung der PFGE ist die Bestimmung des Gehalts und der Größe von Plasmiden eines Isolats. Dafür wird die bakterielle DNA mit der S1-Nuklease verdaut. S1-verdaute Plasmide liegen in ihrer linearisierten Form vor, sodass nach der anschließenden Auftrennung ihre Größe bestimmt werden kann (Barton et al., 1995).

1.1.2.4 Plasmidtypisierung

Resistenzgen-tragende Plasmide sind maßgeblich an der Verbreitung und Zunahme von Antibiotikaresistenzen innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* beteiligt (Mathers et al., 2015a). Die Analyse vorhandener Plasmide spielt daher auch in epidemiologischen Untersuchungen eine große Rolle. Aufgrund ihrer Wirtsspezifität lassen sich Resistenz-Plasmide in zwei Gruppen unterteilen: (I) Plasmide mit einem weiten Wirtsspektrum, die leicht zwischen verschiedenen Spezies

übertragen werden können (*broad-host-range plasmids*) und (II) Plasmide, die sich auf eine Spezies beschränken bzw. nur eingeschränkt zwischen Spezies transferiert werden (*narrow-host-range plasmids*) (Mathers et al., 2015a). Die Klassifizierung von Plasmiden erfolgte zunächst basierend auf dem Prinzip der Inkompatibilität. Plasmide derselben Inkompatibilitätsgruppe (Inc-Gruppe) besitzen den gleichen Replikationsmechanismus und können daher nicht gemeinsam in der Bakterienzelle bestehen (Carattoli, 2009). Die Bestimmung der Inc-Gruppe durch Einbringen des zu bestimmenden Plasmids in Bakterien (z.B. durch Transformation oder Konjugation), die Plasmide tragen, deren Inc-Gruppe bekannt ist, wurde abgelöst durch das auf Hybridisierung basierende *Replicon Typing* (Couturier et al., 1988). Die verwendeten Proben richten sich gegen Gene, die an der Plasmidreplikation beteiligt sind und somit für die Inkompatibilität verantwortlich sind. Seit 2005 steht ein PCR-basiertes *Replicon Typing* (PBRT)-Schema zur Verfügung mit dem basierend auf 18 Primerpaaren die wichtigsten Plasmidfamilien bzw. Inc-Gruppen innerhalb der *Enterobacteriaceae* identifiziert werden können (Carattoli et al., 2005). Zur Durchführung der PBRT-PCRs ist ein kommerzielles Kit erhältlich. Es wurde um weitere Primerpaare ergänzt, sodass in acht Multiplex-PCRs insgesamt 25 Replikons nachgewiesen werden können. Über das Webtool PlasmidFinder können zudem seit 2014 ausgehend von Ganzgenom-Daten die im sequenzierten Isolat vorhandenen Plasmide typisiert werden (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) (Carattoli et al., 2014). Dabei werden die assemblierten Daten mit der Replikon-Datenbank abgeglichen. Die Datenbank wurde basierend auf den Sequenzen vollständig in der NCBI *nucleotide collection* hinterlegter Plasmide erstellt (Carattoli et al., 2014) und umfasst aktuell 122 Replikons (Stand 09/2017).

1.1.2.5 Besitz von Virulenzfaktoren

Für *K. pneumoniae* sind eine Reihe von Virulenzfaktoren, die einen Einfluss auf die Infektiosität haben, beschrieben. Eine wichtige Rolle spielen, neben der bereits genannten Kapsel, am Eisenhaushalt beteiligte Faktoren (Paczosa and Mecsas, 2016). Dazu zählen die Siderophor-Systeme Yersiniabactin, Colibactin, Salmochelin und Aerobactin, sowie das ABC-Eisentransportsystem Kfu. Im Rahmen der Immunantwort kommt es zu einer Reduktion des freien Eisens durch den Wirt (Paczosa and Mecsas, 2016). Siderophore sind Proteine, die eine höhere Affinität für Eisen besitzen als die wirtseigenen Eisentransportproteine und so dem Bakterium ermöglichen auch in eisenarmen Umgebungen zu überleben (Paczosa and Mecsas, 2016). Die verschiedenen Siderophore unterscheiden sich in der Affinität für Eisen und der Hemmbarkeit durch Wirtsfaktoren (Paczosa and Mecsas, 2016). Ebenfalls von Relevanz als Virulenzfaktor sind Fimbrien. Das *mrk*-Gencluster kodiert für Typ 3-Fimbrien, die die Bindung an Epithelzellen und Proteine der extrazellulären Matrix, sowie die Ausbildung von Biofilmen vermitteln (Hornick et al., 1992; Jagnow and Clegg, 2003; Struve et al., 2009; Tarkkanen et al., 1997). Weitere Virulenzfaktoren, die zur Charakterisierung von *K.*

pneumoniae-Isolaten herangezogen werden können, sind das Zwei-Komponenten-System Kvg, ein Allantoinase-Gencluster und Microcin (Holt et al., 2015).

1.2 Antibiotikaresistenzen in *K. pneumoniae*

Die Zunahme von Antibiotikaresistenzen ist ein weltweites Problem, das auch Vertreter der *Enterobacteriaceae* betrifft. Bei *K. pneumoniae* wird insbesondere die Resistenz gegenüber Polymyxinen und den zur Gruppe der Beta-Laktam-Antibiotika gehörenden Carbapenemen mit Sorge beobachtet. Details zur Wirkweise dieser zwei Antibiotikagruppen und zu möglichen Resistenzursachen finden sich ab 1.2.1. Die meisten Resistenz-vermittelnden Gene, die in den letzten zwei Jahrzehnten entdeckt wurden und sich anschließend innerhalb der gramnegativen Bakterien ausbreiteten, wurden zuerst in *K. pneumoniae* beschrieben (z.B. die Beta-Laktamase-Gene (*bla*) *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} und das Colistin-Resistenz-vermittelnde *mcr-I*-Gen) (Wyres et al., 2016).

K. pneumoniae tritt seit den 1970er Jahren als Verursacher nosokomialer Infektionen auf. *K. pneumoniae*-Isolate besitzen bis auf wenige Ausnahmen die Beta-Laktamase SHV als chromosomal codierte Beta-Laktamase. Diese wird konstitutiv und meist in nur geringen Mengen exprimiert, die aber ausreichend sind, um die Resistenz gegenüber Ampicillin, Amoxicillin, Carbenicillin und Ticarcillin zu vermitteln (Livermore, 1995). Verantwortlich für den Erfolg von *K. pneumoniae* ist neben hohen Kolonisationsraten der Erwerb von weiteren Antibiotikaresistenzgenen (Tzouveleakis et al., 2012). Aufgrund der Aufnahme von Plasmiden, die Resistenzen gegenüber Aminoglykosiden und später auch gegenüber *extended-spectrum*-Beta-Laktamen vermittelten, sowie der Entstehung von Resistenz gegenüber Fluorchinolonen aufgrund chromosomaler Mutationen, wurden zur Therapie nosokomialer *K. pneumoniae*-Infektionen Carbapeneme eingesetzt (Tzouveleakis et al., 2012). Berichte über Carbapenem-resistente *K. pneumoniae* blieben bis ins Jahr 2005 selten. Es folgte jedoch eine starke Ausbreitung, sodass Carbapenem-resistente *K. pneumoniae* heute nicht nur ein weltweites Auftreten zeigen (Nordmann, 2014), sondern auch als Hauptverursacher von Infektionen mit Carbapenem-resistenten Bakterien gelten (World Health Organization, 2014).

Neben der Produktion von Carbapenemasen können Veränderungen in der Expression von Porinen die Ursache einer Carbapenemresistenz sein. OmpK35 und OmpK36 sind Porine in der äußeren Membran von *K. pneumoniae*. In *extended-spectrum*-Beta-Laktamase (ESBL)-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolaten führt der Verlust beider Porine zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Carbapenemen (Martínez-Martínez, 2008).

ESBL- bzw. Carbapenemase-produzierende gramnegative Bakterien sind oft nicht nur resistent gegenüber fast allen bzw. allen verfügbaren Beta-Laktam-Antibiotika, sondern weisen gleichzeitig Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen und Aminoglykosiden auf. Während zur Therapie von

Infektionen mit ESBL-produzierenden *K. pneumoniae* Carbapenem-Antibiotika zum Einsatz kommen können, bleiben zur Therapie von Infektionen mit Carbapenemase-produzierenden *K. pneumoniae* und anderen gramnegativen Keimen nur Tigecyclin und Antibiotika, die in der Vergangenheit, aufgrund Bedenken hinsichtlich der Effizienz und/oder Toxizität, in der Humanmedizin kaum zum Einsatz kamen, wie Polymyxine und Fosfomycin (Meletis, 2016). Diese können entweder als Monotherapie oder als Kombinationstherapie, gegebenenfalls in Kombination mit einem Carbapenem-Antibiotikum, eingesetzt werden (Meletis, 2016). Seit kurzem stehen zur Therapie von Infektionen mit multiresistenten gramnegativen Bakterien außerdem die zwei Beta-Laktam-Inhibitor-Kombinationen Ceftazidim/Avibactam und Meropenem/Vaborbactam zur Verfügung. Sie sind wirksam gegenüber Serin-Beta-Laktamase-produzierenden Bakterien und damit eine Option zur Behandlung von Infektionen mit *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-produzierenden *K. pneumoniae*. Aufgrund der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten bei Infektionen mit Carbapenem-resistenten *K. pneumoniae* wird auch nach Alternativen zur Antibiotikatherapie gesucht. Eine Möglichkeit könnte der Einsatz von Phagen sein (D'Andrea et al., 2017), eine andere Möglichkeit das Verhindern der Infektion durch einen Impfstoff (Seeberger et al., 2017).

1.2.1 Beta-Laktam-Antibiotika

1.2.1.1 Wirkweise und Resistenz

Seit der Entdeckung von Penicillin, dem ersten Beta-Laktam-Antibiotikum, durch Alexander Fleming im Jahr 1928 wurde eine Vielzahl weiterer Beta-Laktam-Antibiotika mit anderen Wirkspektren entdeckt und synthetisiert (Zeng and Lin, 2013). Heute haben Beta-Laktam-Antibiotika einen Anteil von über 50 % am weltweiten Antibiotikamarkt. Beta-Laktam-Antibiotika hemmen die Zellwandsynthese und bewirken so die Lyse und in der Folge den Tod der Bakterienzelle. Erreicht wird dies durch Acylierung und damit Inaktivierung Penicillin-bindender Proteine (PBPs), die essentiell für die bakterielle Zellwandsynthese sind (Zeng and Lin, 2013). PBPs sind Transpeptidasen, die den letzten Schritt der Peptidoglykan-Synthese katalysieren. Gemeinsam ist allen Beta-Laktam-Antibiotika der Beta-Laktamring (in rot, siehe Abbildung 1). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu D-Alanyl-D-Alanin (siehe Abbildung 1), dem eigentlichen Substrat der PBPs, können die Beta-Laktam-Antibiotika im aktiven Zentrum der PBPs binden und so die Peptidoglykan-Synthese hemmen.

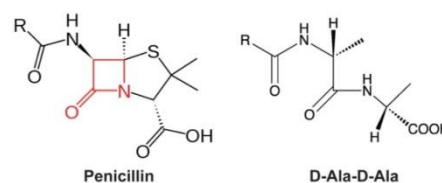


Abbildung 1 Vergleich der Strukturformeln von Penicillin und D-Alanyl-D-Alanin, dem eigentlichen Substrat der Penicillin-bindenden-Proteine

Der Beta-Laktam-Ring des Penicillins ist rot hervorgehoben, Quelle: (Zeng and Lin, 2013)

Gramnegative Bakterien haben eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um der Wirkung von Beta-Laktam-Antibiotika entgegenzuwirken. Die wichtigste Rolle spielt die Produktion von Beta-Laktamasen, also von Enzymen, die den Beta-Laktam-Ring hydrolysieren und dadurch das Antibiotikum inaktivieren. Weitere Mechanismen sind die Produktion von PBPs mit einer geringeren Affinität für Beta-Laktam-Antibiotika, die Expression veränderter Porine, sodass die Antibiotika nicht über die äußere Membran zu den PBPs gelangen, und die verstärkte Expression von Effluxpumpen (Zeng and Lin, 2013).

1.2.1.2 Klassifizierung von Beta-Laktamasen

Zur Klassifizierung von Beta-Laktamasen sind heute zwei Schemata gebräuchlich (Bush and Jacoby, 2010). Bei der Klassifizierung nach Ambler werden die Enzyme basierend auf ihrer Aminosäuresequenz in vier Gruppen eingeteilt (molekulare Klassifizierung). Die Klassen A, C und D enthalten Serin-Beta-Laktamasen, die in ihrem aktiven Zentrum ein Serin besitzen. Beta-Laktamasen der Klasse B hingegen sind Metallo-Beta-Laktamasen. Sie besitzen in ihrem aktiven Zentrum mindestens ein Zinkion. Die Einteilung nach Bush, Jacoby und Medeiros basiert auf den Hydrolyse- bzw. Inhibitionsprofilen der Enzyme. Diese funktionelle Klassifizierung erlaubt im Gegensatz zur Klassifizierung nach Ambler, eine Korrelation von Gruppenzugehörigkeit und Resistenzphänotyp (Bush and Jacoby, 2010).

1.2.1.3 *Extended spectrum*-Beta-Laktamasen und Carbapenemasen

Bereits vor dem Einsatz von Penicillin zur Therapie bakterieller Infektionen wurde in *Escherichia coli* (*E. coli*) die erste Beta-Laktamase identifiziert (Bradford, 2001). Viele gramnegative Bakterien besitzen chromosomal codierte Beta-Laktamasen, die sich vermutlich, aufgrund des Selektionsdrucks verursacht durch Beta-Laktam-produzierende Organismen im Boden, aus den Penicillin-bindenden Proteinen entwickelt haben. Die erste plasmid-codierte Beta-Laktamase in gramnegativen Bakterien (TEM-1) wurde zu Beginn der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts in *E. coli* beschrieben (Bradford, 2001). In den darauf folgenden Jahren zeigte sich ein Wechselspiel aus dem Auftreten neuer Beta-Laktamase-Varianten und der Entwicklung immer neuer Beta-Laktam-Antibiotika-Klassen, die möglichst resistent gegenüber der Hydrolyse durch Beta-Laktamasen sein sollten. So wurden zu Beginn der 80er Jahre Cephalosporine der dritten Generation in den Markt eingeführt. Diese waren nicht nur wirksam gegenüber den meisten Beta-Laktamase-produzierenden Bakterien, sondern zeichneten sich durch eine geringere Nephrotoxizität im Vergleich zu Aminoglycosiden und Polymyxinen aus (Paterson and Bonomo, 2005). Die Bezeichnung *Extended-Spectrum-Beta-Lactamases* (ESBL) wurde zunächst für TEM- und SHV-Varianten, die kurze Zeit nach der Markteinführung der Drittgenerations-Cephalosporine auftraten und durch Mutation der klassischen TEM- und SHV-Beta-Laktamasen entstanden waren, verwendet. Diese neuen Varianten besaßen ein

erweitertes Hydrolysespektrum und waren dadurch im Gegensatz zu den klassischen Varianten in der Lage, Oxyimino-Cephalosporine zu hydrolysieren (Livermore, 2008). In der Klassifizierung nach Bush, Jacoby und Medeiros werden diese ersten ESBLs der Gruppe 2be zugeordnet (= durch Clavulansäure-hemmbar Breitspektrum-Beta-Laktamasen, die in der Lage sind Oxyimino-Cephalosporine wie Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftriaxon und Cefepim, sowie das Monobactam Aztreonam zu hydrolysieren) (Bush and Jacoby, 2010). In den folgenden Jahren wurden weitere Enzyme mit ähnlichen Hydrolyse- und Inhibitionsprofilen identifiziert, die aber evolutionär nicht verwandt mit TEM und SHV sind, darunter beispielsweise Vertreter der Gruppen CTX-M, PER und VEB (Livermore, 2008). Ebenfalls als ESBL eingeordnet werden verschiedene Varianten der OXA-Beta-Laktamasen. Sie gehören allerdings zur molekularen Klasse D bzw. nach der funktionellen Klassifizierung zur Klasse 2d. Sie sind in der Lage Ampicillin und Cefalotin zu hydrolysieren und zeichnen sich durch eine hohe hydrolytische Aktivität gegenüber Oxacillin und Cloxacillin aus. Im Gegensatz zu den ESBLs der Gruppe 2be werden sie nicht durch Clavulansäure inhibiert (Bradford, 2001).

Die Carbapenem-Resistenz klinisch relevanter Spezies, wie *K. pneumoniae* und *E. coli*, ist in den meisten Fällen das Resultat von Mutationen (z.B. in Poringenen) oder der Aufnahme eines Resistenzgens über horizontalen Gentransfer (Meletis, 2016). Der erste Bericht über das Auftreten eines Carbapenemase-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolats wurde im Jahr 2001 veröffentlicht. Das Isolat wurde Mitte der 90er Jahre in den USA isoliert (Yigit et al., 2001). Das Carbapenemase-Gen lag auf einem 50 kb-großen Plasmid und vermittelte nicht nur die Resistenz gegenüber den Carbapenemantibiotika Imipenem und Meropenem, sondern auch gegenüber Penicillinen, Cephalosporinen und Aztreonam. Clavulansäure und Tazobactam wirkten inhibierend. Die neue Carbapenemase wurde zunächst als KPC-1 bezeichnet (Yigit et al., 2001). Später stellte sich jedoch heraus, dass es einen Fehler in der Sequenz des *bla*_{KPC-1}-Gens gab und dass dieses identisch mit dem zwei Jahre darauf beschriebenen *bla*_{KPC-2}-Gen ist (Smith Moland et al., 2003; Yigit et al., 2001). Mittlerweile wurden über 30 verschiedene KPC-Allele identifiziert (*bla*_{KPC-32}, NCBI-Zugangsnummer: NG_055495, Stand 09/2017). Die häufigsten Varianten sind *bla*_{KPC-2} und die sich in nur einem Nukleotid unterscheidende Variante *bla*_{KPC-3} (Mathers et al., 2015a). Während *bla*_{KPC}-Gene lange Zeit nur als Teil von Plasmiden beschrieben wurden (Tzouvelekis et al., 2012), gab es in den letzten Jahren vermehrt Berichte über *K. pneumoniae*-Isolate, in denen *bla*_{KPC}-Gene in das Chromosom integriert vorlagen (Chen et al., 2015; Conlan et al., 2014a; Mathers et al., 2017; Pecora et al., 2015). Carbapenemasen vom Typ KPC gehören zur Ambler Klasse A bzw. nach der funktionellen Klassifizierung zur Gruppe 2f (Yigit et al., 2001).

Ebenfalls eine wichtige Rolle spielen die zur Klasse B (Metallo-Beta-Laktamasen) gehörigen Carbapenemasen NDM, VIM und IMP. Sie vermitteln im Gegensatz zu KPC jedoch keine Resistenz

gegenüber Aztreonam. Inhibiert werden sie durch Chelatoren, wie EDTA und Dipycolinsäure (Pitout et al., 2015), was für den diagnostischen Nachweis genutzt wird. Von besonderer klinischer Relevanz ist NDM (*New Delhi metallo-beta-lactamase*) (Lee et al., 2016a). Das Carbapenemase-Gen *bla*_{NDM-1} wurde erstmals im Jahr 2008 in einem *K. pneumoniae*-Isolat entdeckt. Es lag auf einem 180 kb-großen Plasmid. Das Isolat stammte von einem schwedischen Patienten, der zuvor nach Indien gereist und dort in einem Krankenhaus behandelt worden war (Yong et al., 2009).

OXA-48, die wichtigste Carbapenemase der Klasse D in *K. pneumoniae* wurde erstmals in einem Isolat, das im Jahr 2001 in der Türkei isoliert wurde, beschrieben (Poirel et al., 2004). OXA-48 hydrolysiert Penicilline, aber keine Breitspektrum-Cephalosporine. Die Carbapenemaseaktivität fällt im Vergleich zu KPC und den Carbapenemasen der Klasse B geringer aus (Pitout et al., 2015).

1.2.2 Polymyxin-Antibiotika

Für den klinischen Gebrauch stehen zwei Polymyxin-Antibiotika zur Verfügung: Polymyxin B und Polymyxin E (auch unter dem Namen Colistin bekannt) (Velkov et al., 2013). Nicht alle Mechanismen, die für die antimikrobielle Wirkung von Polymyxinen verantwortlich sind, konnten bereits im Detail aufgeklärt werden (Velkov et al., 2013). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass Polymyxine über die Interaktion mit dem Lipid A-Anteil von Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, in die äußere Membran gelangen und eine Fusion der inneren Lipidschicht der äußeren Membran mit der äußeren Schicht der Zytoplasmamembran verursachen. Das dadurch entstehende osmotische Ungleichgewicht könnte verantwortlich für den Tod der Zelle sein (Velkov et al., 2013). Der häufigste Resistenzmechanismus gegenüber Colistin ist die Modifikation von LPS. Das Anfügen positiv geladener Gruppen an Lipid A bewirkt eine Reduzierung der negativen Ladung der äußeren Membran und damit eine verminderte elektrostatische Anziehung der Polymyxine (Olaitan et al., 2014a). Frühere Analysen zeigten, dass in *K. pneumoniae* die Zwei-Komponentensysteme PhoP/PhoQ, PmrA/PmrB (Olaitan et al., 2014a), und CrrA/CrrB (Cheng et al., 2016b; Wright et al., 2015) an der Regulation der Modifikation von Lipid A beteiligt sind. So wurden bereits diverse Veränderungen in Proteinen dieser Signalwege beschrieben, die zur Resistenz gegenüber Colistin führen (Cheng et al., 2016b; Olaitan et al., 2014a; Wright et al., 2015). Dass die Resistenz gegenüber Colistin nicht nur über Mutationen in chromosomalen Genen vermittelt werden kann, sondern auch durch ein plasmid-codiertes Gen (*mcr-1*) und somit auch über horizontalen Gentransfer verbreitet werden kann, wurde erstmals im Jahr 2015 beschrieben (Liu et al., 2016). Die *mcr-1*-vermittelte Resistenz basiert ebenfalls auf der Modifikation von LPS. MCR-1 gehört zur Familie der Phosphoethanolamin-Transferasen und modifiziert Lipid A durch das Anfügen von Phosphoethanolamin (Liu et al., 2016). Das *mcr-1*-Gen wurde zunächst in *E. coli*- und *K. pneumoniae*-Isolaten aus China nachgewiesen (Liu et al., 2016). In Folge der Publikation wurden weltweit *Enterobacteriaceae*-Isolate unterschiedlichen Ursprungs (Tier, Tierprodukte, Mensch, Umwelt) auf

das Vorkommen des *mcr-I*-Gens untersucht. Dabei zeigte sich eine Verbreitung von *mcr-I* über alle Kontinente hinweg (Al-Tawfiq et al., 2016; Ellem et al., 2017). Mittlerweile wurden sechs Varianten des *mcr-I*-Gens (*mcr-I.2* – *mcr-I.7* je eine Aminosäure Unterschied zu *mcr-I*) (Yin et al., 2017), sowie vier weitere *mcr*-Gen-Varianten (*mcr-2* – *mcr-5*) beschrieben (Borowiak et al., 2017; Carattoli et al., 2017; Xavier et al., 2016; Yin et al., 2017).

1.3 Die Populationsstruktur von *K. pneumoniae*

In einer der bisher größten Ganzgenom-basierten Studien zur Populationsstruktur von *K. pneumoniae* wurden mehr als 300 *K. pneumoniae* (*sensu lato*)-Isolate untersucht (Holt et al., 2015). Dabei zeigten phylogenetische Analysen des Kerngenoms (= Gesamtheit der Gene, die allen untersuchten Genomen gemeinsam ist), dass sich die *K. pneumoniae*-Population durch das Vorhandensein einer Vielzahl tief abzweigender phylogenetischer Linien auszeichnet, die von einem einzelnen gemeinsamen Vorfahren abgehen (Holt et al., 2015; Wyres and Holt, 2016). Die insgesamt 283 untersuchten *K. pneumoniae*-Isolate verteilten sich auf 157 phylogenetische Linien (Holt et al., 2015). Die Anzahl phylogenetischer Linien innerhalb der Gesamtpopulation dürfte jedoch weit höher liegen und bis in die Tausende gehen (Wyres and Holt, 2016). Die einzelnen Linien unterschieden sich in durchschnittlich 0,46 % der SNPs (*single nucleotide polymorphism*) des Kerngenoms. Genome derselben Linie gehörten zumeist zum gleichen Sequenztyp und unterschieden sich in 0,02 % (Holt et al., 2015).

Antibiotikaresistenzen treten in vielen verschiedenen phylogenetischen Linien bzw. klonalen Gruppen (*clonal groups*, CG) auf. Jedoch zeigen nur wenige eine weltweite Verbreitung und besitzen trotz der Abwesenheit von Virulenzfaktoren ein hohes Infektionspotenzial. Die wohl bekannteste klonale Gruppe ist CG258. Neben ST258, dem wichtigsten Vertreter dieser Gruppe gehören u.a. die Sequenztypen ST512, ST11, ST340 und ST437 zur CG258. Isolate des Sequenztyps ST258 treten hauptsächlich in Kombination mit den Carbapenemasen KPC-2 oder KPC-3 auf und gelten als Hauptverursacher von Infektionen mit Carbapenem-resistenten *K. pneumoniae* (Wyres and Holt, 2016). Der erfolgreiche Klon entstand vermutlich ca. 1995-1997 in den USA. Seine Entstehung wird auf eine Reihe von Rekombinationsereignissen zurückgeführt (Wyres and Holt, 2016). So deuten Untersuchungen von Gaiarsa et al. darauf hin, dass ein mit dem Sequenztyp ST1628 verwandter Stamm der Ursprung eines ca. 1,3 Mb großen Fragments ist, das vor 1985 in ein ST11-Vorläuferisolat transferiert wurde (Gaiarsa et al., 2015). Der Sequenztyp ST258 entstand dann vermutlich durch eine Rekombination von 1,1 Mbp zwischen einem ST11-Vorläuferisolat und einem ST442-ähnlichen Isolat. Im Anschluss kam es zur Aufnahme eines mobilen Elements (ICE258.2) (Chen et al., 2014a). Ein weiteres Rekombinationsereignis führte zur Entstehung zwei verschiedener Kladen innerhalb des Sequenztyps ST258. Die zwei Kladen unterscheiden sich in einem ca. 215 kb-großen Genomabschnitt, der auch das *cps*-Gencluster enthält (DeLeo et al., 2014). Das *cps*-Gencluster der Klade I (*cps1*) stammt möglicherweise von einem ST42-Isolat (DeLeo et al., 2014) und enthält das *wzi*-Allel 29

(D'Andrea et al., 2014). Isolate der Klade II besitzen das *wzi*-Allel 154 (D'Andrea et al., 2014). Insgesamt wurden für Isolate der CG258 bisher 22 verschiedene Kapseltypen beschrieben (Wyres and Holt, 2016).

Einige klonale Linien innerhalb der *K. pneumoniae*-Population zeichnen sich durch einen erhöhten Gehalt an Virulenzgenen aus (Holt et al., 2015). Diese als hypervirulent bezeichneten Isolate können auch in Personen ohne Vorerkrankungen schwere Infektionen hervorrufen und zeigen häufig einen hypermukoviskösen Phänotyp (Shon et al., 2013). Bekannte virulente *K. pneumoniae*-Klone sind die Sequenztypen ST23 und ST57 (beide CG23), ST86, ST375 und ST380 (Shon et al., 2013). Auch wenn sich in den meisten Fällen keine Überschneidung zwischen den Populationen hypervirulenter und multiresistenter (klassischer) *K. pneumoniae* zeigt (Bialek-Davenet et al., 2014a), gibt es sowohl Berichte über multiresistente CG258-Isolate, die Virulenzgene erworben haben (Holt et al., 2015), als auch Berichte über eine Zunahme der Resistenz in Vertretern hypervirulenter Linien (Li et al., 2014).

1.4 Die Bedeutung multiresistenter *K. pneumoniae* in Deutschland

Multiresistente gramnegative Erreger (MRGN) werden in Deutschland in der klinischen Diagnostik in Abhängigkeit von ihrem Resistenzphänotyp als 3MRGN bzw. 4MRGN bezeichnet. Isolate der Gruppe 3MRGN zeigen sich resistent gegenüber drei der vier folgenden Antibiotikaklassen: Acylureidopenicilline (Indikatorsubstanz Piperacillin), 3./4. Generations-Cephalosporine (Indikatorsubstanzen Cefotaxim und Ceftazidim), Carbapeneme (Indikatorsubstanzen Imipenem und Meropenem) und Fluorchinolone (Indikatorsubstanz Ciprofloxacin), während als 4MRGN eingestufte Isolate resistent gegenüber allen vier Antibiotikaklassen sind (KRINKO, 2012). Im Jahr 2016 lagen die Resistenzraten von *K. pneumoniae* gegenüber den Carbapenemen Imipenem und Meropenem bei 0,3 % bzw. 0,4 % im stationären Bereich und bei 0,1 % im ambulanten Bereich. Resistent gegenüber den Drittgenerations-Cephalosporinen Cefotaxim und Ceftazidim zeigten sich im stationären Bereich 13,7 % bzw. 9,5 % und im ambulanten Bereich 13,0 % bzw. 8,4 % der Isolate (Robert Koch-Institut: ARS, <https://ars.rki.de>, Datenstand: 09.10.2017). Bezogen auf die Resistenzraten für Drittgenerations-Cephalosporine bei invasiven *K. pneumoniae* lag Deutschland im europäischen Vergleich im Mittelfeld (Daten aus 2015, siehe Abbildung 2) (European Centre for Disease Prevention and Control., 2017). Die Resistenzraten für Carbapeneme lagen auch für die anderen europäischen Länder unter den Resistenzraten für Drittgenerations-Cephalosporine. Die höchsten Carbapenemresistenzraten zeigten sich in Griechenland (61,9 %), Italien (33,5 %) und Rumänien (24,7 %), während Carbapenem-resistente *K. pneumoniae* in der Mehrheit der Länder, darunter Deutschland, im Jahr 2015 weniger als ein Prozent der untersuchten Isolate ausmachten. Ein signifikanter Anstieg der Carbapenem-Resistenzraten konnte im Zeitraum 2012 – 2015 für Kroatien, Portugal, Rumänien und Spanien verzeichnet werden (European Centre for Disease Prevention and Control., 2017).

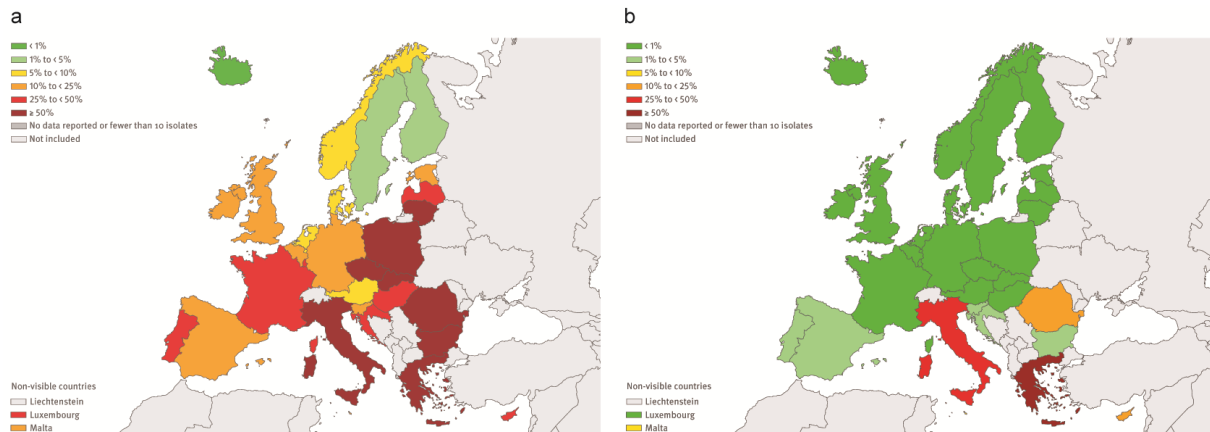


Abbildung 2 Prozentualer Anteil invasiver *K. pneumoniae*-Isolate mit Resistenz gegenüber (a) Cephalosporinen der 3. Generation bzw. (b) Carbapenemen im Jahr 2015 im europäischen Vergleich

(Quelle: European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015, Stockholm: ECDC, 2017, © European Centre for Disease Prevention and Control, 2017)

In Deutschland ist in etwa der Hälfte der Fälle die Produktion einer Carbapenemase die Ursache für die beobachtete Carbapenem-Resistenz von *K. pneumoniae*-Isolaten. So konnte bei 50,9 % der Carbapenem-resistenten Isolate, die im Jahr 2016 an das Nationale Referenzzentrum (NRZ) für gramnegative Krankenhauskeimer eingesendet wurden, ein Carbapenemase-Gen nachgewiesen werden (Pfennigwerth, 2017). Die im Zeitraum 2010 bis 2014 am häufigsten nachgewiesenen Carbapenemase-Gene waren *bla*_{KPC-2}, *bla*_{KPC-3}, *bla*_{OXA-48} und *bla*_{NDM-1}. Die Häufigkeit dieser vier Carbapenemasen in *K. pneumoniae* aus Deutschland ist in Abbildung 3 dargestellt. Über den gesamten Zeitraum war OXA-48 die am häufigsten nachgewiesene Carbapenemase. KPC-2 war bis 2013 die zweithäufigste Carbapenemase und wurde 2014 durch NDM-1 abgelöst. Für NDM-1 zeigte sich von 2010 bis 2014 eine mehr als zehnfache Steigerung (2010: 1,8 %; 2014: 22,2 %).

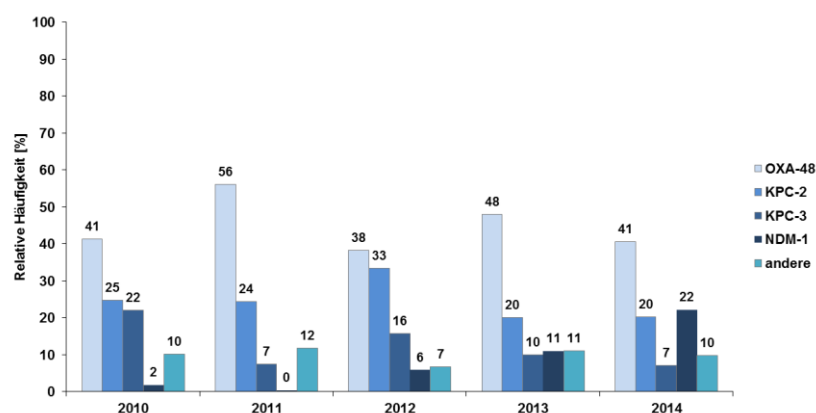


Abbildung 3 Häufigkeit der Carbapenemasen OXA-48, KPC-2, KPC-3 und NDM-1

Gezeigt ist der Anteil der vier Carbapenemasen KPC-2, KPC-3, OXA-48 und NDM-1 an den Carbapenemase-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolaten, die auf freiwilliger Basis in den entsprechenden Jahren an das NRZ zur Typisierung übersandt wurden (Abbildung erstellt anhand einer vom NRZ erhaltenen Liste der eingesendeten *K. pneumoniae*-Isolate).

1.4.1 Ausbrüche verursacht durch multiresistente *K. pneumoniae* in Deutschland

Trotz der vergleichsweise geringen Prävalenz wurden in den vergangenen Jahren in Deutschland mehrere Ausbrüche verzeichnet, die durch multiresistente *K. pneumoniae* verursacht wurden.

Der erste durch einen KPC-2-produzierenden *K. pneumoniae*-Stamm verursachte Ausbruch in Deutschland ereignete sich von Januar bis Juni 2008. Von den insgesamt acht betroffenen Patienten zeigten drei eine Infektion mit dem Ausbruchsstamm (Wendt et al., 2010).

Von Juli 2010 bis April 2013 kam es zum bisher größten Ausbruch mit KPC-2-produzierenden *K. pneumoniae* (ST258) in Deutschland. Von den insgesamt 105 betroffenen Patienten waren 60 mit dem Ausbruchsstamm kolonisiert und 45 zeigten eine Infektion (Kaiser et al., 2017). Als Eintragsquelle konnte ein aus Griechenland transferierter Patient identifiziert werden. Neben Mensch-zu-Mensch-Übertragungen spielten vermutlich kontaminierte Lagerungskissen als Infektionsquelle eine Rolle (Kaiser et al., 2017; Lippmann et al., 2014). Maßnahmen wie beispielsweise PCR-basierte Screenings auf Carbapenem-resistente Enterobakterien, die Kohortierung KPC-positiver Patienten und die strenge Einhaltung der Händehygiene trugen zur Eindämmung des Ausbruchs bei (Lippmann et al., 2014). Retrospektiv erfolgte eine Ganzgenom-basierte Aufarbeitung des Ausbruchs (Kaiser et al., 2017).

Ein deutlich kleinerer Ausbruch ereignete sich von Juli 2010 bis Januar 2011. Von insgesamt sieben betroffenen Patienten zeigten fünf eine Infektion und zwei eine Kolonisation mit dem KPC-2- und VIM-1-produzierenden *K. pneumoniae*-Stamm. Die Isolation betroffener Patienten, eine intensivste Händehygiene sowie regelmäßige Screenings konnten weitere Übertragungen verhindern (Steinmann et al., 2011).

Insgesamt acht Patienten einer Intensivstation waren in einen Ausbruch zwischen Mai und Juni 2013 involviert. Der OXA-48-produzierende Ausbruchsstamm wurde u.a. durch ein defektes Bronchoskop übertragen (Zweigner et al., 2014).

Ebenfalls zu Übertragungen durch ein Endoskop kam es während eines Ausbruchs von Dezember 2012 bis Januar 2013. Insgesamt 12 Patienten von vier Stationen zeigten eine Kolonisation bzw. Infektion mit dem OXA-48-produzierenden Ausbruchsstamm. Das kontaminierte Duodenoskop war vermutlich verantwortlich für die Übertragung auf fünf der 12 Patienten (Kola et al., 2015).

Ein über mehrere Jahre andauernder Ausbruch trat in der pädiatrischen Klinik eines deutschen Krankenhauses auf (Haller et al., 2015). Insgesamt 37 Säuglinge, von denen zehn eine Sepsis zeigten, waren von dem Ausbruch betroffen. Verursacht wurde der Ausbruch durch einen CTX-M-15-produzierenden Stamm des Sequenztyps ST514. Auch intensive Maßnahmen zur Eindämmung, wie beispielsweise die zwischenzeitliche Schließung und Renovierung der betroffenen Station, konnten weitere Übertragungen nicht verhindern, sodass die Station im Jahr 2012 endgültig geschlossen wurde.

Ganzgenom-basierte Berechnungen im Rahmen der Ausbruchsanalyse legen nahe, dass der Ausbruchsstamm bereits seit 2008 endemisch im Krankenhaus vorkam und somit für ca. drei Jahre unentdeckt blieb (Haller et al., 2015).

1.5 Ganzgenom-Sequenzierung in der mikrobiologischen Forschung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen für die Ganzgenom-Sequenzierung bakterieller Isolate zwei verschiedene *Next-Generation-Sequencing* (NGS)-Technologien zum Einsatz (Illumina- und PacBio-Sequenzierung). Unter dem Begriff *NGS* werden die seit etwa zehn Jahren verfügbaren Sequenzieretechnologien zusammengefasst, die das parallele Sequenzieren verschiedener DNA-Sequenzen mit einem sehr hohen Durchsatz ermöglichen (Levy and Myers, 2016). Zu den zahlreichen Einsatzmöglichkeiten von *NGS* in der mikrobiologischen Forschung zählen neben der umfassenden Typisierung von bakteriellen Isolaten (z.B. hinsichtlich Resistenz- und Virulenzprofil), phylogenetische Analysen zur Surveillance und als Teil von Ausbruchsuntersuchungen (Didelot et al., 2012).

Die wichtigsten Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Technologien sind in Tabelle 1 gegenübergestellt. Aufgrund der kurzen *Read*-Länge eignet sich die Illumina Miseq-Sequenzierung besonders für eine Referenz-basierte Rekonstruktion (*Mapping*: Alignierung kurzer *Reads* gegen eine längere Referenzsequenz (Ekblom and Wolf, 2014)), während die mehrere Kilobasen großen *Reads*, die während der PacBio-Sequenzierung entstehen, eine gute Grundlage für die *de novo*-Assemblierung, also die Rekonstruktion ohne eine Referenzsequenz, darstellen.

Tabelle 1 Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Sequenzieretechnologien
(gemäß Herstellerangaben)

	Illumina (Miseq)	PacBio (RSII)
Prinzip	<i>Sequencing-by-Synthesis</i> , Brückenamplifikation	<i>Sequencing-by-Synthesis</i> , Einzelmolekül
Read-Länge	2 × 300 bp	> 20 kb
Laufzeit	4 – 55 Stunden	30 Minuten bis sechs Stunden
Datenmenge pro Lauf	15 Gb, max. 25 Millionen <i>Reads</i>	pro <i>SMRT cell</i> : 0,5 – 1 Gb

1.5.1 Prinzip der PacBio-Sequenzierung

Zur Vorbereitung auf die PacBio-Sequenzierung wird die zu sequenzierende DNA zunächst fragmentiert (Rhoads and Au, 2015). Die erhaltenen doppelsträngigen Fragmente werden an ihren Enden mit als *Hairpin* vorliegenden Adaptern ligiert, sodass die sogenannte *SMRT bell* entsteht. Im Bereich dieser Adapter binden die Primer. Die Sequenzierung erfolgt in der sogenannten *SMRT cell*. Diese besteht aus 150 000 Vertiefungen, an deren Boden sich jeweils ein einzelnes immobilisiertes Polymerasemolekül befindet (*zero-mode waveguide* (ZMW)). Durch Diffusion gelangt jeweils eine *SMRT bell* in eine der Vertiefungen. Ausgehend von den *Hairpin*-Adaptern beginnt die Polymerase mit der Replikation. Die vier Nukleotide sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, sodass das jeweils eingebaute Nukleotid durch den beim Einbau freigesetzten Lichtimpuls identifiziert werden kann. Die Kinetik des Lichtimpulses gibt zudem Informationen über mögliche Basenmodifikationen, wie z.B. Methylierungen (Rhoads and Au, 2015).

1.5.2 Prinzip der Illumina-Sequenzierung

Bei der Illumina-Sequenzierung wird die zu sequenzierende DNA in einem Schritt fragmentiert und mit Adaptern versehen. Dieser Prozess wird durch Transposomen katalysiert. Im nächsten Schritt wird die DNA über Primer, deren Sequenz komplementär zu den Adaptern ist, amplifiziert und mit den sogenannten Indexsequenzen versehen, die später die Identifizierung der einzelnen Proben ermöglichen. Es folgt eine Aufreinigung der DNA, die wahlweise mit einer Selektion bestimmter Fragmentgrößen kombiniert werden kann. Für die eigentliche Sequenzierung werden die *Libraries* an die Oberfläche der sogenannten *flow cell* gebunden. Dabei binden die zu sequenzierenden DNA-Fragmente über ihre Adapter an Oligonukleotide, die sich auf der *flow cell* befinden. Ausgehend vom gebundenen Oligonukleotid wird ein zur zu sequenzierenden DNA komplementärer Strang erzeugt. Im Anschluss wird der ursprüngliche DNA-Strang entfernt. Das freie Ende des neuen DNA-Strangs bindet nun ebenfalls an ein komplementäres Oligonukleotid. Dieses dient im nächsten Schritt als Primer für die sogenannte Brückenamplifikation (*bridge amplification*). Nach der Amplifikation werden die Stränge durch Denaturierung voneinander getrennt und können nun ihrerseits mit ihrem ungebundenen Ende an ein freies Oligonukleotid binden. Durch Wiederholung dieser Schritte entstehen klonale Cluster der verschiedenen zu sequenzierenden DNA-Fragmente. Im nächsten Schritt werden alle *Reverse*-Stränge entfernt und die *Forward*-Stränge werden durch Zugabe von Polymerase, Primern und fluoreszenz-markierten Nukleotiden sequenziert. Ausgehend von den Primern wird ein komplementärer Strang erstellt. Nach dem Einbau jeweils eines Nukleotids wird ein Bild erstellt. Erst nach enzymatischer Entfernung des Farbstoffs kann das nächste Nukleotid eingebaut werden. Im Falle einer *paired-end*-Sequenzierung wird im Anschluss an die Sequenzierung der *Forward*-Stränge der im Rahmen der Sequenzierung neusynthetisierte Strang entfernt. Das freie Ende des noch gebundenen Strangs bindet an ein Oligonukleotid und es erfolgt eine erneute Brückenamplifikation. Allerdings

werden nun die *Forward*-Stränge entfernt, um dann die Reverse-Stränge zu sequenzieren (Illumina Technology Spotlight: Illumina Sequencing, Pub.No. 770-2007-002).

1.5.3 Extraktion bakterieller DNA für die Ganzgenom-Sequenzierung

Um bakterielle DNA für die anschließende Ganzgenom-Sequenzierung zu extrahieren, wird heute in den meisten Fällen auf kommerziell erhältliche DNA-Extraktionskits zurückgegriffen, die neben einer hohen DNA-Qualität, eine gute Reproduzierbarkeit, einen vergleichsweise geringen Zeitaufwand sowie eine einfache Handhabung versprechen. Hingegen zeichnen sich die meisten klassischen Methoden der DNA-Extraktion, aufgrund einer Vielzahl an Wasch- und Präzipitationsschritten, durch einen hohen Arbeits- und Zeitaufwand aus (Berensmeier, 2006). Methoden zur DNA-Extraktion lassen sich grundsätzlich in zwei Kategorien unterteilen: (I) lösungsbasierte (*solution-based*) Methoden und (II) Methoden, bei denen DNA-bindende Materialien zum Einsatz kommen (*solid-phase*) (Tan and Yiap, 2009).

DNA-bindende Materialien, die häufig in kommerziell erhältlichen Kits Anwendung finden, sind Silica (Siliciumdioxid) und Anionenaustauscher. Silica wird in Säulen-basierten DNA-Extraktionskits eingesetzt oder in Kits, die Magnetpartikel (*Beads*) verwenden, deren Oberfläche mit Silica beschichtet ist. Die DNA-bindenden Eigenschaften von Silica basieren auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der DNA und der Silicaoberfläche in Gegenwart chaotroper Salze (Berensmeier, 2006). Zum Waschen der DNA werden alkoholhaltige Puffer verwendet (Grieß et al., 2007). Anschließend erfolgt die Elution der DNA durch Zugabe von Wasser oder einem Puffer mit einer geringen Ionenstärke (Tan and Yiap, 2009). Die Aufreinigung von DNA über Anionenaustauscherchromatografie basiert auf der Bindung der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA an die positiv geladene Anionenaustauschermatrix aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen (Grieß et al., 2007). Die Elution der DNA erfolgt durch Zugabe eines Puffers mit hoher Salzkonzentration (Tan and Yiap, 2009). Verunreinigungen, wie Proteine und RNA, lösen sich bei niedrigeren Salzkonzentrationen als die DNA und können so durch Waschschrte mit Puffern mittlerer Salzkonzentration entfernt werden (Tan and Yiap, 2009). Zum Entsalzen und Konzentrieren der DNA folgt eine Fällung mit Alkohol (Grieß et al., 2007).

Auch sogenannte *salting-out*-Protokolle, die zu den lösungsbasierten Methoden gehören, sind in Form von kommerziellen Kits erhältlich. *Salting-out*-Protokolle basieren auf dem Fällen der zellulären Proteine aus dem Lysat durch Zugabe von Salzen („Aussalzen“). Durch die hohe Salzkonzentration verlieren die Proteine ihre Hydrathülle, fallen aus und können abzentrifugiert werden. Aus dem Überstand kann im nächsten Schritt durch Ethanolzugabe die DNA präzipitiert werden (Miller et al., 1988).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollen insgesamt vier Projekte bearbeitet werden.

(I) **Rekonstruktion der Genomsequenz des *K. pneumoniae*-Isolats 234/12**

Das *K. pneumoniae*-Isolat 234/12 wurde aufgrund seines mehrere hundert Kilobasen großen Plasmids ausgewählt, um den Einfluss verschiedener DNA-Extraktionskits auf die anschließende Miseq-Sequenzierung zu untersuchen (Projekt II). Das Isolat war bereits im Rahmen der Doktorarbeit von Christoph Eller unter Verwendung verschiedener Technologien sequenziert worden, eine ring-geschlossene Sequenz von Chromosom und Plasmid lag jedoch nicht vor (Eller, 2014). Der erste Schritt dieser Arbeit soll daher die möglichst vollständige Rekonstruktion der Genomsequenz aus den vorliegenden Sequenzdaten sein.

(II) **Vergleich von DNA-Extraktionskits zur Extraktion von bakterieller DNA für die Miseq-Sequenzierung**

Die Extraktion qualitativ hochwertiger DNA stellt den ersten Schritt einer erfolgreichen Sequenzierung dar. So konnte gezeigt werden, dass die Reinheit der DNA Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der *Library*-Herstellung (Lamble et al., 2013) und die Verteilung der *Reads* entlang des sequenzierten Genoms (van Heesch et al., 2013) hat. Weiterhin wurde beschrieben, dass Konformation (linear/*super-coiled*) und Größe der aufzureinigenden DNA Einfluss auf die Silica- bzw. Anionenaustauscher-basierte Aufreinigung haben können (Budelier and Schorr, 2001; Melzak et al., 1996). Da *K. pneumoniae*-Isolate neben ihrem Chromosom häufig Plasmide unterschiedlicher Größe besitzen, soll anhand des *K. pneumoniae*-Isolats 234/12 untersucht werden, inwieweit die Wahl des DNA-Extraktionskit Einfluss auf das Sequenzierergebnis nimmt. Dazu soll mit verschiedenen DNA-Extraktionskits DNA aus derselben Bakterienkultur isoliert und anschließend Miseq-sequenziert werden. Folgende Parameter sollen bei der Auswertung berücksichtigt werden: Qualität und Menge der extrahierten DNA, die Qualität der *Libraries* und die *Sequencing Coverage* der verschiedenen Replikons. Zeitaufwand und Kosten sollen ebenfalls in den Vergleich einfließen.

(III) **Genomische Diversität Carbapenemase-produzierender *K. pneumoniae* in Deutschland**

Carbapenem-resistente *K. pneumoniae* spielen auch in Deutschland eine wichtige Rolle als Verursacher nosokomialer Infektionen. Eine über die Bestimmung des Resistenzphänotyps hinausgehende Typisierung klinischer Isolate findet jedoch meist nur im Rahmen von Ausbruchsuntersuchungen statt und ist nicht Teil der Routinediagnostik. Während hinsichtlich der Häufigkeit der verschiedenen Carbapenemasen in Deutschland durch die Arbeit des NRZ für gramnegative Krankenhauserreger eine gute Datenlage besteht, liegen kaum Daten zur

Häufigkeit einzelner Sequenztypen und zur Populationsstruktur von *K. pneumoniae* in Deutschland vor. Ziel dieses Teilprojekts ist daher die Charakterisierung der deutschen Population Carbapenemase-produzierender *K. pneumoniae*. Dafür sollen 107 klinische *K. pneumoniae*-Isolate aus den Jahren 2008 bis 2014 Ganzgenom-sequenziert werden (Illumina Miseq). Die Ganzgenom-Daten sollen einerseits zur Bestimmung von Sequenztyp (MLST), Gehalt an Beta-Laktamase- und Virulenzgenen, Kapseltyp und Gehalt an Plasmiden und andererseits zur Berechnung von Stammbäumen, auch unter Einbeziehung internationaler *K. pneumoniae*-Isolate, genutzt werden.

(IV) Analyse eines Ausbruchsgeschehen mit 3MRGN-Klebsiella

Im Frühjahr 2015 wurde in einer deutschen Rehabilitationsklinik ein gehäuftes Auftreten ESBL-produzierender *K. pneumoniae* verzeichnet. Publikationen aus den letzten Jahren belegen die zahlreichen Einsatzmöglichkeiten der Ganzgenom-Sequenzierung in Ausbruchsfällen (für Beispiele siehe (Haller et al., 2015; Stoesser et al., 2014; Zhou et al., 2015)) und so soll auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Ganzgenom-Sequenzierung eingesetzt werden, um das Ausbruchsgeschehen zu untersuchen. Ziel ist neben der Charakterisierung der Isolate (MLST, Besitz von Resistenzgenen, Kapseltyp), die Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse der Isolate sowie die Entwicklung einer für den Ausbruchsstamm spezifischen PCR.

2 Material & Methoden

2.1 Material

Im Folgenden finden sich alle im Rahmen der Arbeit verwendeten Materialien sowie die zum Einsatz gekommenen Geräte und die verwendete Software.

2.1.1 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN GmbH – Germany, Hilden
DreamTaq Green PCR Mastermix (2×)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DreamTaq PCR Mastermix (2×)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Genomic-tip 20/G	QIAGEN GmbH – Germany, Hilden
MagAttract HMW DNA Kit	QIAGEN GmbH – Germany, Hilden
MasterPure DNA Purification Kit	Epicentre, Madison, USA
MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycle)	Illumina Inc., San Diego, USA
MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle)	Illumina Inc., San Diego, USA
Nextera XT DNA Sample Prep Kit (24 Samples)	Illumina Inc., San Diego, USA
Nextera XT Index Kit (24 Indices, 96 Samples)	Illumina Inc., San Diego, USA
Plasmid Mini Kit	QIAGEN GmbH – Germany, Hilden
QIAfilter Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH – Germany, Hilden
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega GmbH, Mannheim

2.1.2 Kulturmedien und Agarplatten

Bezeichnung	Hersteller
Brain-Heart-Infusion (BHI)-Bouillon*	BD GmbH, Heidelberg
chromID CARBA SMART-Agar	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Galle-Chrysoidin-Glycerol (GCG)-Agar*	sifin diagnostics GmbH, Berlin
Mueller-Hinton (MH)-Agar mit Schafblut	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Nährbouillon, pH 6,8*	BD GmbH, Heidelberg

* Herstellung durch das Labor für Nährmedien (RKI) gemäß Herstellervorschrift

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Agencourt AMPure XP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
BlueJuice Gel Loading Buffer (10×)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Cryobank Gelb (64)	Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld
Etest Imipenem, Ertapenem und Meropenem	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Ethanol reinst	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multiplate 96-Well PCR Plates, weiß	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nunc MicroWell 96-Well-Platten, schwarz mit transparentem Boden	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Qubit Assay Tubes	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SeaKem Gold Agarose	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz
UltraPure DEPC-Treated Water	Life technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
VITEK 2 AST-N248-Karte	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen

2.1.4 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
10× FastDigest Green Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest BamHI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest EcoRI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest HindIII	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest SalI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proteinase K (20 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNase A (100 mg/ml)	QIAGEN GmbH – Germany, Hilden
S1 Nuklease (100 U/μl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
XbaI (50 U/μl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.5 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
BioPhotometer plus	Eppendorf AG, Hamburg
CFX96 Real-Time PCR Detection System und C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CHEF-DR III Pulsed Field Electrophoresis System inklusive Cooling Module	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Chemidoc XRS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fluorimager FLA-2000	Fujifilm, Tokio, Japan
Miseq	Illumina Inc., San Diego, USA
Qubit 3.0 Fluorometer	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer F1.5	Eppendorf AG, Hamburg
VITEK 2	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen

2.1.6 Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ladepuffer	40 mg Na ₂ -EDTA 4 g Saccharose 3 mg Bromphenolblau ad 10 ml ddH ₂ O
10× Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer	890 mM Tris 20 mM EDTA 890 mM Borsäure
<i>Cell Suspension Buffer</i> (CSB) – PFGE pH 8,0	100 mM Tris 100 mM EDTA
Lysepuffer – PFGE	50 mM Tris, pH 8,0 50 mM EDTA, pH 8,0 1 % Sarcosyl-Lösung
Laufpuffer – PFGE pH 8,5	5,4 g Tris 2,75 g Borsäure 0,365 g EDTA ad 1 l ddH ₂ O 1,5 ml Thioharnstoff-Lösung (1 %)
TE-Puffer – PFGE	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA

2.1.7 Software

Name	Version	Hersteller bzw. Referenz
A5-miseq	20150522	(Coil et al., 2015)
AIDA Image Analyzer Software	5.0	raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
ART	2.5.8	(Huang et al., 2012)
BASReader	3.16	raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
BWA-SW	0.7.12-r1039 und 0.7.13-r1126	(Li and Durbin, 2009)
FigTree	1.4.2/1.4.3	http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/
Geneious	7.1.4 – R10	Biomatters Limited, Auckland, Neuseeland (Kearse et al., 2012)
ISfinder	-	http://www-is.biotoul.fr (Siguier et al., 2006)
iTOL	v3	https://itol.embl.de/ (Letunic and Bork, 2016)
Kodon	3.62	Applied Maths NV
PHASTER	-	(Arndt et al., 2016; Zhou et al., 2011)
Prokka	1.8	(Seemann, 2014)
RAxML	8.2.7	(Stamatakis, 2014)
RefRank	2.1.0.0 und 2.1.2	https://gitlab.com/s.fuchs/refRank
SAMtools	0.1.19	(Li et al., 2009)
Seaview	4.6.1	(Gouy et al., 2010)
SMRT Portal	2.3.0	Pacific Biosciences, Menlo Park, USA
SNPFilter	2.2.0	https://gitlab.com/s.fuchs/snpFilter
Trimmomatic	0.32	(Bolger et al., 2014)
varscan	2.3	(Koboldt et al., 2009)
getinsertsizes.py		https://gist.github.com/davidliwei/2323462

2.1.8 Primer

Alle verwendeten Primer wurden über Invitrogen, Thermo Fisher Scientific bezogen.

Name	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge [bp]	Verwendete Konzentration	Protokoll	Referenz
Plasmid_4831_R	GAACGACTCACCACACGATTC	980	0,2 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 5 min	Diese Arbeit
Plasmid_4831_F	CGCTGTGAGGCCTCTTATGAC		0,2 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 5 min	Diese Arbeit
Plasmid_3777_F10	CAGCAACGGAGAAGGTTATGACGAAA GAAG	921	0,2 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 5 min	Diese Arbeit
Plasmid_3777_R1	CCACCCTATTTCCCGGCCATTTCTG		0,2 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 5 min	Diese Arbeit
hem-F	GGGTTTGGTTGTATTAAATGCCACG	379	0,1 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) ×25, 72 °C, 5 min	Diese Arbeit
hem-R	CCCAATCGCTTTATTTTCCTGACG		0,1 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) ×25, 72 °C, 5 min	Diese Arbeit
4,160 kb-F	GTTAGAATCAAGATGCACAGTACGC	606	0,1 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) ×25, 72 °C, 5 min	Diese Arbeit
4,160 kb-R	CCATGGATTGAACTTGGTGTGAG		0,1 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) ×25, 72 °C, 5 min	Diese Arbeit
unique-F	CACAAATTCCCATCTGAGGTCATG	265	0,2 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) ×25, 72 °C, 5 min	Diese Arbeit
unique-R	CCACCAAAGCTAAATACTTCGCTG		0,2 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) ×25, 72 °C, 5 min	Diese Arbeit
wzi_for2	GTGCCGCGAGCGCTTTCTATCTTGGTA TTCC	580	0,2 µM	94 °C 2 min, (94 °C 30 s, 55 °C 40 s, 72 °C 30 s) ×30, 72 °C, 5 min	(Brisse et al., 2013)
wzi_rev	GAGAGCCACTGGTTCCAGAAYTTSACC GC		0,2 µM	94 °C 2 min, (94 °C 30 s, 55 °C 40 s, 72 °C 30 s) ×30, 72 °C, 5 min	(Brisse et al., 2013)

Name	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge [bp]	Verwendete Konzentration	Protokoll	Referenz
infb-F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTCG CTGCTGGACTATATTCG	506	0,2 µM	95 °C 2 min, (95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 4 min	<a href="http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri
mers_used.html">http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri mers_used.html , Protokoll 2
infb-R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCTTT CAGCTCAAGAACTTC		0,2 µM	95 °C 2 min, (95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 4 min	<a href="http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri
mers_used.html">http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri mers_used.html , Protokoll 2
pgi-F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGAGA AAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	610+	0,2 µM	95 °C 2 min, (95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 4 min	<a href="http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri
mers_used.html">http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri mers_used.html , Protokoll 2
pgi-R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCC ACGCTTTATAGCGGTTAAT		0,2 µM	95 °C 2 min, (95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 4 min	<a href="http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri
mers_used.html">http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri mers_used.html , Protokoll 2
phoe-F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACCT ACCGCAACACCGACTTCTTCGG	646	0,2 µM	95 °C 2 min, (95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 4 min	<a href="http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri
mers_used.html">http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri mers_used.html , Protokoll 2
phoe-R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCA GAACTGGTAGGTGAT		0,2 µM	95 °C 2 min, (95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 4 min	<a href="http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri
mers_used.html">http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri mers_used.html , Protokoll 2
gapa-F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAA ATATGACTCCACTCACGG	706	0,2 µM	95 °C 2 min, (95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 4 min	<a href="http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri
mers_used.html">http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri mers_used.html , Protokoll 2
gapa-R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTCAG AAGCGGCTTTGATGGCTT		0,2 µM	95 °C 2 min, (95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 4 min	<a href="http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri
mers_used.html">http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri mers_used.html , Protokoll 2
mdh-F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACCCA ACTCGTTTCAGGTTTCAG	800	0,2 µM	95 °C 2 min, (95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 4 min	<a href="http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri
mers_used.html">http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri mers_used.html , Protokoll 2
mdh-R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTT TTCCCCAGCAGCAG		0,2 µM	95 °C 2 min, (95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 4 min	<a href="http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri
mers_used.html">http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri mers_used.html , Protokoll 2
tonb1-F	GATTTACCTCGCCGCTTTC	666	0,2 µM	95 °C 2 min, (95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 4 min	Yvonne Pfeifer, nicht publiziert
tonb1-R	CGGTCTTCCCTGCTGATAAC		0,2 µM	95 °C 2 min, (95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 4 min	Yvonne Pfeifer, nicht publiziert
MLST-KP-F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA			Sequenzierung, T _A 50 °C	<a href="http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri
mers_used.html">http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri mers_used.html , Protokoll 2
MLST-KP-R	TTGTGAGCGGATAACAATTTTC			Sequenzierung, T _A 50 °C	<a href="http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri
mers_used.html">http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/pri mers_used.html , Protokoll 2

Name	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge [bp]	Verwendete Konzentration	Protokoll	Referenz
rpoB-R	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGAGTCT TCGAAGTTGTAACC		0,2 µM	95 °C 2 min, (95 °C 15 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 4 min	http://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/primers_used.html , Protokoll 2
Chromosome-F (qPCR)	TCACTTCCGGGTCGTCAATG	100	0,5 µM	95.0 °C 7 min, (95.0 °C 10 s, 55.0 °C 15 s, 72.0 °C 30 s) ×40	(Becker et al., 2016)
Chromosome-R (qPCR)	ATGGAAGCACTGGAGTCACG		0,5 µM	95.0 °C 7 min, (95.0 °C 10 s, 55.0 °C 15 s, 72.0 °C 30 s) ×40	(Becker et al., 2016)
362-kb-F (qPCR)	CAGTTTGCCATGCCCAGAAC	106	0,5 µM	95.0 °C 7 min, (95.0 °C 10 s, 55.0 °C 15 s, 72.0 °C 30 s) ×40	(Becker et al., 2016)
362-kb-R (qPCR)	CTCCGACCCACAACATCC		0,5 µM	95.0 °C 7 min, (95.0 °C 10 s, 55.0 °C 15 s, 72.0 °C 30 s) ×40	(Becker et al., 2016)
4.8-kb-F (qPCR)	TCAAGCATGGCAGGATCAGG	100	0,5 µM	95.0 °C 7 min, (95.0 °C 10 s, 55.0 °C 15 s, 72.0 °C 30 s) ×40	(Becker et al., 2016)
4.8-kb-R (qPCR)	ACAGGCCATGCTCCTTCTTG		0,5 µM	95.0 °C 7 min, (95.0 °C 10 s, 55.0 °C 15 s, 72.0 °C 30 s) ×40	(Becker et al., 2016)
3.8-kb-F (qPCR)	TCTCGCATGTGTATCCTTCAGG	103	0,5 µM	95.0 °C 7 min, (95.0 °C 10 s, 55.0 °C 15 s, 72.0 °C 30 s) ×40	(Becker et al., 2016)
3.8-kb-R (qPCR)	TCGCTGGATGTTAAGGAAGATGG		0,5 µM	95.0 °C 7 min, (95.0 °C 10 s, 55.0 °C 15 s, 72.0 °C 30 s) ×40	(Becker et al., 2016)
SHV rev (SHVu)	GGTTAGCGTTGCCAGTGCT	938	0,16 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	(Gröbner et al., 2009)
SHV-FWD-neu (SHVu)	GCAAAACGCCGGGTATTC		0,16 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	(Gröbner et al., 2009)
KPC aF	CGCCGTCTAGTTCTGCTGTC	723	0,4 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 5 min	Yvonne Pfeifer, nicht publiziert
KPC nR	AGTCATTTGCCGTGCCATAC		0,4 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 5 min	(Gröbner et al., 2009)

Name	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge [bp]	Verwendete Konzentration	Protokoll	Referenz
NDM-2-R	TAGTGCTCAGTGTCGGCATC		0,2 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 5 min	Yvonne Pfeifer, nicht publiziert
OXA-48-F	AAATCACAGGGCGTAGTTGTG	555	0,2 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 5 min	(Gröbner et al., 2009)
OXA-48-R	GACCCACCAGCCAATCTTAG		0,2 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×35, 72 °C, 5 min	(Gröbner et al., 2009)
mcr-1 F (CLR5-F)	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	309	0,12 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 45 s) ×30, 72 °C, 10 min	(Liu et al., 2016)
mcr-1 R (CLR5-R)	CTTGGTCGGTCTGTAGGG		0,12 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 45 s) ×23, 72 °C, 10 min	(Liu et al., 2016)
OXA-1-ges F	TATCTACAGCAGCGCCAGTG	718	0,27 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 min	(Pfeifer et al., 2011)
OXA-1-ges R	TAAATTCGACCCCAAGTTTCC		0,27 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 min	(Pfeifer et al., 2011)
mgrB_ext_Fd	AAGGCGTTCATTCTACCACC	253	0,2 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	(Cannatelli et al., 2014)
mgrB_ext_R	TTAAGAAGGCCGTGCTATCC		0,2 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	(Cannatelli et al., 2014)
TEM universal fwd (temforw)	ATGAGTATTCAACATTTCCG	851	0,32 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	(Grimm et al., 2004)
TEM universal rev (temrev)	TTAATCAGTGAGGCACCTAT		0,32 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	(Grimm et al., 2004)
SHV-MP-1 FWD	TTCGCCTGTGTATTATCTCC	750	0,16 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	(Cullik et al., 2010)
SHV-MP-1 REV	TCCGCTCTGCTTTGTTATTC		0,16 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	(Cullik et al., 2010)

Name	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge [bp]	Verwendete Konzentration	Protokoll	Referenz
CTX-M-9-MP-R	TATCATTGGTGGTGCCGTAG		0,12 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	(Gröbner et al., 2009)
CTX-M universal fwd	CGCTTTGCGATGTGCAG	551	0,16 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	(Gröbner et al., 2009)
CTX-M universal rev	ACCGCGATATCGTTGGT		0,16 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	(Gröbner et al., 2009)
ompK36-a-F	CTCCTGGTACCGGCTCTG	414	0,27 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	Yvonne Pfeifer, nicht publiziert
ompK36-a-R	GGACTGCAGGAAGTTGTCAG		0,27 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	Yvonne Pfeifer, nicht publiziert
ompk35-b-F	GGTCTGGTTGACGGTCTGAG	537	0,27 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	Yvonne Pfeifer, nicht publiziert
ompk35-b-R	GGTGTAAATCGTTGTCGTCCAG		0,27 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	Yvonne Pfeifer, nicht publiziert
ompk35-a-F	GCAATATTCTGGCAGTGGTG	533	0,27 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	Yvonne Pfeifer, nicht publiziert
ompk35-a-R	ACGGTCGTGGTCGTTTTTAC		0,27 µM	95 °C 5 min, (95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min) ×30, 72 °C, 5 °min	Yvonne Pfeifer, nicht publiziert

2.2 Molekular- und mikrobiologische Methoden

2.2.1 Herkunft der Isolate

2.2.1.1 *K. pneumoniae* 234/12

Das *K. pneumoniae*-Isolat 234/12 stammt aus einem Ausbruch auf einer neonatologischen Station in Bremen und wurde im Jahr 2011 aus einer Blutkultur isoliert (Haller et al. 2015).

2.2.1.2 Carbapenemase-produzierende *Klebsiella*-Isolate aus Deutschland

Insgesamt 107 Carbapenemase-produzierende *Klebsiella*-Isolate wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Ganzgenom-sequenziert. Die sequenzierten Isolate stammten aus Einsendungen an das Robert Koch-Institut (RKI) zwischen 2008 und 2014 und wurden, um eine möglichst repräsentative Sammlung zu erhalten, durch Isolate aus Einsendungen an das NRZ für gramnegative Krankenhauserreger in den Jahren 2010 bis 2014 ergänzt.

2.2.1.3 ESBL-produzierende *Klebsiella*-Isolate aus einem Ausbruchsgeschehen

Die im Rahmen der Ausbruchsanalyse Ganzgenom-sequenzierten Isolate stammten aus einer Neurorehabilitationsklinik in Deutschland. Die Isolierung aus Patientenmaterial erfolgte durch das Routinelabor der Klinik. Insgesamt 53 Isolate wurden für die Ganzgenom-Analyse an das RKI geschickt.

2.2.2 Kultivierung von *K. pneumoniae*

2.2.2.1 Agarplatten

Neu eingetroffene Isolate wurden routinemäßig auf GCG-Agar und MH-Agar mit Schafblut oder auf chromID CARBA SMART-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden alle Isolate auf Reinheit überprüft und gegebenenfalls vereinzelt. Außerdem wurden Cryokulturen angelegt.

2.2.2.2 Cryokulturen

Zur Langzeitaufbewahrung der Bakterienstämme wurden Cryokulturen angelegt. Dazu wurden Cryobank-Röhrchen mit je einer Kolonie beimpft. Die Röhrchen wurden kurz geschüttelt und das Medium wurde vollständig abgenommen. Die Lagerung der Röhrchen erfolgte bei -80 °C. Zur Rekultivierung wurde ein Kügelchen entnommen und auf einer Agarplatte ausgestrichen.

2.2.2.3 Kultivierung von *K. pneumoniae* als Flüssigkultur

Als Ausgangsmaterial für die Extraktion bakterieller DNA zur Ganzgenom-Sequenzierung dienten Flüssigkulturen. Dafür wurde die entsprechende Menge BHI-Boullion unter sterilen Bedingungen mit einer Kolonie beimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C und 140 *rpm*. Die Kulturen wurden anschließend gemäß dem entsprechenden Kitprotokoll zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das so erhaltene Bakterienpellet wurde entweder sofort weiterverwendet oder bis zur DNA-Extraktion bei -20 °C gelagert.

2.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Um in den Experimenten zum Vergleich der verschiedenen DNA-Extraktionskits jeweils die empfohlene Zellzahl einsetzen zu können, wurde die durchschnittliche Zellzahl pro Milliliter einer 40 ml-Übernachtskultur (im 100 ml-Kolben) bestimmt. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe der Übernachtskultur (in NaCl) angesetzt und ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien der 10⁻⁶-Verdünnung ausgezählt und die Zellzahl berechnet. Für das Isolat 234/12 ergab sich eine Zellzahl von ca. 4 × 10⁹ Zellen pro Milliliter.

2.2.3 Extraktion bakterieller DNA

Die Wahl der DNA-Extraktionsmethode war von der weiteren Verwendung der DNA abhängig. Als Ausgangsmaterial für PCRs diente Koch-DNA. Um bakterielle DNA für die Ganzgenom-Sequenzierung zu gewinnen, wurde entweder das DNeasy Blood & Tissue Kit oder das MagAttract HMW DNA Kit verwendet. Im Rahmen des Vergleichs verschiedener DNA-Extraktionskits wurden insgesamt sechs verschiedene Kits verwendet.

2.2.3.1 Koch-DNA

Zur Herstellung von Koch-DNA wurden ca. 10 Bakterienkolonien mit einem Glasstab von einer Agarplatte aufgenommen und in 100 µl Wasser eingerieben. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 96 °C wurden die Proben für ca. 10 Minuten bei 4 °C abgekühlt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 10 000 *rpm*. Der Überstand wurde in PCRs eingesetzt.

2.2.3.2 DNeasy Blood & Tissue Kit

Die DNA-Extraktion mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit erfolgte gemäß dem Kitprotokoll für gramnegative Bakterien (Version 1037951, 07/2006). Der Lyseschritt erfolgte für mindestens zwei Stunden. Der optionale RNase-Verdau wurde durchgeführt (4 µl RNase A, 3 Minuten). Abweichend vom Kitprotokoll wurde die DNA in Nuklease-freiem Wasser (statt in AE-Puffer) eluiert.

2.2.3.3 MagAttract HMW DNA Kit

Die DNA-Extraktion mit dem MagAttract HMW DNA Kit erfolgte gemäß dem Kitprotokoll für gramnegative Bakterien (Version 1078080, 08/2013). Die DNA wurde zweimal in 50 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert.

2.2.3.4 MasterPure DNA Purification Kit

Die DNA-Extraktion mit dem MasterPure DNA Purification Kit erfolgte gemäß dem Kitprotokoll für Zellproben (Version Lit. # 113, 6/2012). Abweichend vom Kitprotokoll wurde die DNA in Nuklease-freiem Wasser (statt in TE-Puffer) wiederaufgenommen.

2.2.3.5 Wizard Genomic DNA Purification Kit

Die DNA-Extraktion mit dem Wizard Genomic DNA Purification Kit erfolgte gemäß dem Kitprotokoll für gramnegative Bakterien (Version TM050, 12/10). Nach der RNase-Zugabe erfolgte eine einstündige Inkubation. Abweichend vom Kitprotokoll wurde die DNA in Nuklease-freiem Wasser (statt in *DNA Rehydration Solution*) wiederaufgenommen.

2.2.3.6 Plasmid Mini Kit

Die DNA-Extraktion mit dem Plasmid Mini Kit erfolgte gemäß dem Kitprotokoll (Version 1071257, 04/2012). Wie im Protokoll empfohlen, wurde der Elutionspuffer QF auf 65 °C vorgewärmt. Abweichend vom Kitprotokoll wurde die DNA in Nuklease-freiem Wasser (statt in TE-Puffer) wiederaufgenommen.

2.2.3.7 Genomic-tip 20/G

Die DNA-Extraktion mit dem Genomic-tip 20/G-Kit erfolgte gemäß dem Kitprotokoll für gramnegative Bakterien (Version 1071264, 04/2012). Das Lysat wurde vor dem Laden auf die Säule zentrifugiert (10 Minuten, 5 000 ×g, 4 °C). Die DNA wurde in Nuklease-freiem Wasser wiederaufgenommen und nicht, wie im Kitprotokoll angegeben, in TE-Puffer.

2.2.3.8 QIAfilter Plasmid Midi Kit

Die DNA-Extraktion mit dem QIAfilter Plasmid Midi Kit erfolgte gemäß dem Kitprotokoll (Version 1071258, 04/2012).

2.2.4 Bestimmung von Konzentration und Reinheit der extrahierten DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte sowohl photometrisch, als auch fluorometrisch. Die fluorometrische Messung liefert bezogen auf die DNA-Konzentration verlässlichere Werte, während die photometrische Messung neben der DNA-Konzentration Informationen zur Reinheit der

extrahierten DNA liefert. Vor Verwendung zur *Library*-Herstellung wurde die extrahierte DNA zudem in einem Agarosegel (1,4 %, 1×TBE, 100 Volt, 90 min) aufgetrennt.

2.2.4.1 Photometrische Messung unter Verwendung des BioPhotometers

Die photometrische Konzentrationsbestimmung wurde am Biophotometer gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.4.2 Fluorometrische Messung unter Verwendung des Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kits

Die DNA-Konzentrationsbestimmung mithilfe des Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kits wurde gemäß dem Kitprotokoll (Version MP 07581, Juni 2008) durchgeführt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe des im Kit enthaltenen Lambda DNA Standards (1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,025 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0 µg/ml). Die zumessenden Proben wurden 1:100 bzw. 1:1 000 in 1×TE-Puffer verdünnt. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Die Messung erfolgte in schwarzen 96well-Platten mit transparentem Boden am Fluorimager FLA-2000 unter Verwendung der BASReader-Software. Zur Auswertung wurden die AIDA Image Analyzer-Software verwendet.

2.2.4.3 Fluorometrische Messung unter Verwendung des Qubit ds DNA HS Assay Kits

Die DNA-Konzentrationsbestimmung am Qubit 3.0 Fluorometer wurde gemäß dem Kitprotokoll durchgeführt.

2.2.5 Miseq-Sequenzierung

Für die Ganzgenom-Sequenzierung bakterieller Isolate im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Illumina Miseq verwendet. Zur Vorbereitung der DNA auf die Sequenzierung wurden sogenannte (*Sequencing*) *Libraries* hergestellt. Die Herstellung dieser *Libraries* erfolgte mithilfe des Nextera XT *Library* Preparation Kits.

2.2.5.1 Nextera XT *Library* Präparation

Die Herstellung der *Libraries* wurde gemäß dem Herstellerprotokoll (Version Part # 15031942 Rev. C, Oktober 2012) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente in Nuklease-freiem Wasser gelöste DNA, die mittels eines Kits extrahiert wurde. Die Konzentration der verwendeten DNA wurde entweder mithilfe des Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kits oder mithilfe des Qubit Fluorometric Quantitation Kits bestimmt und anschließend auf 0,2 ng/µl eingestellt. Für die Verdünnung der DNA sowie für alle weiteren Schritte wurde UltraPure DEPC-Treated Water verwendet. Die Tagmentierung der DNA und die PCR-Amplifikation wurden in PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurden je 30 µl AMPure-Beads eingesetzt.

2.2.5.2 Qualitätskontrolle der *Libraries*

Um den Erfolg der *Library*-Herstellung zu überprüfen und die Größenverteilung der DNA-Fragmente sowie ihre Menge zu bestimmen, wurden die *Libraries* im Anschluss an die PCR-Aufreinigung mittels einer Chip-basierten Elektrophorese untersucht. Es wurde das Agilent High Sensitivity DNA Kit gemäß Herstellerprotokoll verwendet (Version G2938-90321, 5/09). Dabei wurde jeweils 1 µl der aufgereinigten *Library* eingesetzt.

2.2.5.3 Laden der Proben und Sequenzierung

In dieser Arbeit wurden sowohl Kartuschen der Generation v2, die eine Zyklenzahl bis 500 unterstützen, als auch Kartuschen der neusten Generation (v3), die eine Zyklenzahl bis 600 unterstützen, verwendet. Es wurde jeweils im *paired end*-Modus sequenziert (2×250 bp bzw. 2×300 bp). Die entsprechende Kartusche wurde für zwei Stunden im Wasserbad (Raumtemperatur) aufgetaut. Es wurden zwischen 0,2 und 2,8 µl der normalisierten *Library* eingesetzt. Die normalisierten *Libraries* wurden mit HT1-Puffer gemischt (Gesamtvolumen 600 µl). Es folgten eine Inkubation bei 96 °C für fünf Minuten und eine Inkubation auf Eis für mindestens fünf Minuten.

2.2.6 Puls-Feld-Gelelektrophorese

Um ein Scheren der DNA zu vermeiden, werden für die PFGE die gesamten Zellen in Agaroseblöckchen eingegossen und erst anschließend lysiert (Herschleb et al., 2007). Im Anschluss wird die bakterielle DNA durch Inkubation mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut und das Agarosegel zur Auftrennung der DNA wird um die Agaroseblöckchen herum gegossen. Die einzelnen Arbeitsschritte sind im Folgenden beschrieben.

2.2.6.1 Herstellung der Agaroseblöckchen

Die entsprechenden Isolate wurden auf MH-Agar mit Schafblut ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag wurden sechs Kolonien je Isolat aufgenommen und in 1,5 ml *Cell Suspension Buffer* eingerieben. Anschließend wurden zu je 300 µl Zellsuspension 15 µl Proteinase K gegeben und die Proben wurden bis zur Zugabe der Agarose bei 37 °C im Thermomixer vorinkubiert. Währenddessen wurden im Wasserbad 56 mg SeaKem Gold Agarose in 5 ml TE-Puffer aufgeköcht. Nach kurzem Abkühlen wurden 270 µl SDS (20 %) hinzugegeben und jeweils 315 µl wurden mit der zuvor hergestellten Zellsuspension gemischt und sofort in die Blöckchengießform gefüllt. Nach dem Erkalten wurden die Blöckchen aus der Form gelöst und für drei Stunden bei 56 °C mit Proteinase K verdaut (25 µl Proteinase K in 5 ml Lysepuffer, maximal acht Blöckchen). Es folgten zwei Waschschritte à 10 Minuten mit 56 °C-warmem Wasser, sowie drei weitere Waschschritte mit TE-Puffer. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Blöckchen in TE-Puffer bei 4 °C gelagert.

2.2.6.2 Verdau der bakteriellen DNA

Nach Lyse der Bakterien und Verdau der Proteine durch Proteinase K, konnte die DNA mit Restriktionsenzymen verdaut werden.

S1-Nuklease-Verdau

Zur Vorbereitung auf den Verdau wurden die Agaroseblöckchen für 30 Minuten bei Raumtemperatur in jeweils 150 µl 1× S1-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der Puffer abgenommen und je 100 µl des Restriktionsansatzes wurden zu den Blöckchen gegeben. Es erfolgte eine Inkubation im Thermomixer bei 37 °C und 350 rpm.

Restriktionsansatz:

S1-Puffer (5×)	75 µl
S1-Nuklease	2 µl
Nuklease-freies Wasser	<u>1425 µl</u>
	1500 µl

Nach 45 Minuten wurde der Verdau durch Zugabe von 50 µl Ladepuffer gestoppt.

XbaI-Verdau

Als Größenstandard für alle Pulsfeld-Gele dienten Blöckchen des Isolats *Salmonella Braenderup*, die einem Verdau mit XbaI unterzogen wurden (Ribot et al., 2006). Zur Vorbereitung auf den Verdau wurden die Blöckchen für 30 Minuten bei Raumtemperatur in jeweils 200 µl 1×Tango-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der Puffer abgenommen und je 200 µl des Restriktionsansatzes wurden zu den Blöckchen gegeben. Es erfolgte eine Inkubation im Thermomixer bei 37 °C und 350 rpm.

Restriktionsansatz:

XbaI	32 µl
Tango-Puffer (10×)	320 µl
Nuklease-freies Wasser	<u>2800 µl</u>
	3152 µl

Nach drei Stunden wurde der Verdau durch Zugabe von 50 µl Ladepuffer gestoppt.

2.2.6.3 Laufparameter

Als Laufpuffer und für die Herstellung der Agarosegele (SeaKem Gold Agarose, 1 %) wurde 0,5×TBE-Puffer verwendet. Die Blöckchen wurden auf einen Kamm gelegt und die aufgekochte und anschließend im Wasserbad auf 56 °C temperierte Agarose wurde um die Blöckchen herum gegossen. Die PFGE wurde in einem CHEF-DR III Pulsed Field Electrophoresis-System unter Verwendung der folgenden Parameter durchgeführt:

Initialzeit	1 s
Finalzeit	25 s
Laufzeit	20 h
Winkel	120 °
Spannung	6 Volt/Zentimeter
Temperatur	14 °C

2.2.6.4 PFGE mit Flüssigproben

Die mithilfe von Kits extrahierte DNA ließ sich aufgrund der zum Teil sehr großen DNA-Fragmente in der herkömmlichen Gelelektrophorese nur unzureichend auftrennen. Daher wurde diese DNA mittels der PFGE aufgetrennt. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der extrahierten DNA. Neben den Flüssigproben wurden auch zwei Blöckchen, nämlich *Salmonella Braenderup* verdaut mit XbaI und *K. pneumoniae* 234/12 verdaut mit der S1-Nuklease auf das Gel aufgetragen. Diese wurden wie oben beschrieben hergestellt und in das Gel eingegossen. Um ein Herausspülen der flüssigen Proben aus den Taschen zu verhindern, wurde die Pumpe während der ersten Stunde des Laufs ausgestellt. Die Laufzeit wurde auf 11,5 h verkürzt, um ein Herauslaufen des 3,8 kb-Plasmids und des 4,8 kb-Plasmids zu vermeiden. Als Größenmarker für den Bereich von 20 kb und kleiner wurden 15 µl des 1 kb Plus DNA Ladder aufgetragen.

2.2.6.5 PFGE der Ausbruchs isolate

Die PFGE-Analyse der Ausbruchs isolate wurde vom NRZ für gramnegative Krankenhauserreger unter Verwendung der unten stehenden Parameter durchgeführt (Protokoll verändert nach (Ribot et al., 2006)). Die DNA wurde mit XbaI verdaut. Die Auswertung erfolgte gemäß der Kriterien von (Tenover et al., 1995).

Initialzeit	5 s
Finalzeit	50 s
Laufzeit	20 h
Spannung	6 Volt/Zentimeter
Temperatur	14 °C

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion

In der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden durch Einsatz spezifischer Primer bestimmte Genomabschnitte amplifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden PCRs einerseits eingesetzt, um das Vorhandensein bestimmter Gene bzw. Genomanschnitte nachzuweisen und andererseits, um mithilfe der anschließenden Sanger-Sequenzierung des PCR-Produkts dessen Sequenz zu bestimmen.

2.2.7.1 Einsatz von PCRs zur Typisierung

Im Folgenden sind die PCRs beschrieben, die eingesetzt wurden, um Isolate hinsichtlich ihres Sequenztyps (MLST), ihres Kapseltyps (*wzi*-Typisierung) und ihres Gehalts an Beta-Laktamase-Genen zu charakterisieren.

MLST

Für Isolate, deren Sequenztyp nicht eindeutig aus den Ganzgenom-Daten bestimmt werden konnte, wurden die entsprechenden Allele mittels PCR amplifiziert und die Sequenz anschließend über Sanger-Sequenzierung bestimmt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sowie die PCR-Bedingungen finden sich unter 2.1.8. Zur Sequenzierung wurde das Primerpaar MLST-KP-F/MLST-KP-R eingesetzt. Eine Ausnahme stellt *tonB* dar, hier wurde sowohl zur Amplifikation, als auch zur Sequenzierung das Primerpaar *tonb1*-F/*tonb1*-R eingesetzt.

wzi-Typisierung

Die Bestimmung der *wzi*-Gensequenz erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach dem publizierten Protokoll (Brisse et al., 2013). Dabei wurde das Reaktionsvolumen auf 15 µl verringert. Für ein Isolat wurde ein neuer Vorwärtsprimer (*wzi*-neu-F) designt, weil sich unter Verwendung des *wzi_for2*-Primers kein Produkt zeigte. Die PCR mit anschließender Sanger-Sequenzierung wurde für alle Isolate durchgeführt, deren *wzi*-Sequenz aus den Ganzgenom-Daten nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Zudem wurde die PCR für Isolate durchgeführt, die laut Ganzgenom-Daten ein neues *wzi*-Allel aufwiesen.

Beta-Laktamase-Gene

Der Nachweis der Carbapenemase-Gene *bla*_{KPC-2/3}, *bla*_{OXA-48} und *bla*_{NDM-1} sowie der Beta-Laktamase-Gene *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} und *bla*_{CTX-M} erfolgte jeweils in Multiplex-PCRs. Zum Einzelnachweis von *bla*_{SHV} und *bla*_{OXA} wurde die Primerpaare SHV rev/SHV-FWD-neu bzw. OXA-1-ges F/OXA-1-ges R verwendet.

mcr-1

Der Nachweis des Colistin-Resistenz-vermittelnden Gens *mcr-1* erfolgte unter Verwendung der Primer *mcr-1* F und *mcr-1* R nach dem publizierten Protokoll (Liu et al., 2016).

2.2.7.2 Mutationsanalyse von Resistenz-relevanten Genen

Um die Mutationen, die sich bei der Analyse der Ganzgenom-Daten in dem Gen *mgrB* bzw. in den beiden Poringenen *ompK35* und *ompK36* zeigten, zu bestätigen, wurden diese Gene per PCR amplifiziert und anschließend Sanger-sequenziert.

2.2.7.3 Überprüfung des Ringschlusses des 3,8 kb- und des 4,8 kb-Plasmids

Die Sequenzen des 3,8 kb- und des 4,8 kb-Plasmids des Isolats 234/12 wurden durch ein *de novo-Assembly* von *Miseq-Reads* rekonstruiert. Um den Ringschluss zu bestätigen, wurden Primer designt, die den Bereich um den Ringschluss amplifizierten. Das Primerpaar Plasmid_3777_F/R amplifiziert ein 921 bp-großes Fragment des 3,8 kb-Plasmids, das Primerpaar Plasmid_4831_F/R ein 980 bp-großes Fragment des 4,8 kb-Plasmids.

2.2.7.4 Cluster 1-spezifische Multiplex-PCR

Die drei Primerpaare hem-F/-R, 4,160 kb-F/-R und unique-F/-R bildeten die Cluster 1-spezifische Multiplex-PCR. Der Reaktionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 30 µl. Erläuterungen zum Primer-Design finden sich unter 2.3.6.

2.2.7.5 Sanger-Sequenzierung

Zur Sanger-Sequenzierung von PCR-Produkten wurden die Reagenzien des BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kits gemäß Herstellerangaben verwendet.

Der Reaktionsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	1,0 µl
PCR-Produkt	0,5 µl
Primer (0,8 µM)	2,0 µl
Nuklease-freies Wasser	<u>6,5 µl</u>
	10,0 µl

Cycler-Programmierung:

96 °C	2 min	27x
96 °C	10 s	
T _A	5 s	
60 °C	4 min	
8 °C	∞	

Im Anschluss wurden die Reaktionsansätze bei -20 °C gelagert. Die eigentliche Sequenzierung (Kapillar-Elektrophorese und Fluoreszenzdetektion) fand im Sequenzierlabor des RKI in Berlin statt.

2.2.7.6 Quantitative *real time* PCR zur Bestimmung der Plasmid-Kopiezahl

Das *K. pneumoniae*-Isolat 234/12 wies drei Plasmide unterschiedlicher Größe auf. Die Kopiezahl der Plasmide sollte mithilfe von quantitativen *real time* PCR (qPCRs) bestimmt werden. Bei einer qPCR wird am Ende jedes Zyklus die Menge des vorhandenen PCR-Produkts bestimmt. Der Ct-Wert gibt den Zeitpunkt an, zum dem die Menge des PCR-Produkts erstmals einen bestimmten Schwellenwert übersteigt und gibt damit Auskunft über die eingangs vorhandene DNA-Menge. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR Kit gemäß Herstellerangaben verwendet. Zum Nachweis des PCR-Produkts verwendet dieses Kit den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, der spezifisch an doppelsträngige DNA bindet und im gebundenen Zustand fluoresziert. Die qPCR-Ansätze hatten ein Gesamtvolumen von 20 µl und wurden jeweils in Dreifachbestimmung gemessen. Die Primereffizienz (E) wurde mit Formel 1 ausgehend von einer Verdünnungsreihe aus der Steigung der Standardgeraden (Verdünnungsstufe aufgetragen gegen Ct-Wert) berechnet. Um den möglichen Einfluss unterschiedlicher Reinheitsgrade der DNA zu berücksichtigen, wurde die Primereffizienz unter Verwendung von Koch-DNA und von DNA, die mit dem Genomic-tip-Kit isoliert wurde (stellvertretend für Kit-DNA), bestimmt. Die Plasmidkopiezahl (*plasmid copy number*, PCN) wurde relativ zur Kopiezahl des Chromosoms bestimmt. Zur Berechnung wurde Formel 2 verwendet (C = Chromosom, P = Plasmid) (Škulj et al., 2008).

$$(1) E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

$$(2) PCN = (E_C)^{Ct_C} / (E_P)^{Ct_P}$$

2.2.8 Phänotypische Resistenztestung

Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte zur Bestimmung der phänotypischen Resistenz wurden von Sybille Müller-Bertling und Kirstin Ganske (RKI) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte gemäß der EUCAST-Grenzwerte (Version v 6.0).

2.2.8.1 Bestimmung der Resistenz mittels Etest

Zur Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration (MHK) für Meropenem, Imipenem und Ertapenem wurden Etest-Streifen verwendet. Dazu wurden Kolonien des zu testenden Stamms in 5 ml NaCl eingerieben (McFarland-Standard 0,5). Die Lösung wurde mit einem Tupfer gleichmäßig auf MH-Platten verteilt. Nach dem Antrocknen wurden die Etest-Streifen aufgelegt. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag nach Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

2.2.8.2 Resistenztestung unter Verwendung des Vitek 2-Systems

Die automatisierte Resistenzbestimmung mittels VITEK 2 erfolgte gemäß Herstellervorgaben unter Verwendung der Testkarte AST-N248.

2.2.9 Restriktionsverdau zur Bestätigung der Sequenzen des 3,8 kb- und des 4,8 kb-Plasmids

Um die Sequenz der zwei kleinen Plasmide des Isolats 234/12 zu bestätigen, wurde Plasmid-DNA (isoliert mit dem QIAfilter Plasmid Midi Kit) mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Das Bandenmuster, das sich in der anschließenden Gelelektrophorese zeigte, wurde mit dem theoretisch zu erwartenden Muster verglichen. Folgende Restriktionsenzyme wurden verwendet: HindIII, EcoRI, BamHI und SalI.

Restriktionsansatz:

DNA (ca. 20 ng/μl)	5 μl
Enzym	0,25 μl
10×FD green-Puffer	1,0 μl
Nuklease-freies Wasser	<u>3,75 μl</u>
	10 μl

Die Verdauansätze wurden für 10 Minuten bei 37 °C im PCR-Cycler inkubiert.

2.3 Bioinformatische Methoden

2.3.1 Verfügbarkeit der Rohdaten

Die Rohdaten aller im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Isolate wurden im *European Nucleotide Archive* (ENA, <http://www.ebi.ac.uk/ena>) hinterlegt. Die Daten des Extraktionsvergleichs finden sich unter der *Study Accession Number* PRJEB10820. Die Sequenzdaten der Carbapenemase-produzierenden Isolate sind unter der *Study Accession Number* PRJEB18621 zu finden und die Sequenzdaten der im Rahmen der Ausbruchsanalyse sequenzierten Isolate finden sich unter der *Study Accession Number* PRJEB18059. Die Zugangsnummern der einzelnen Isolate finden sich im Anhang (Tabelle A 7, Tabelle A 8 und Tabelle A 9).

2.3.2 Verarbeitung von Illumina-Sequenzdaten

Ergebnis der Miseq-Sequenzierung sind kurze Sequenzfragmente, sogenannte *Reads*, die im FASTQ-Format gespeichert werden. Neben der eigentlichen Sequenzinformation sind in diesem Dateiformat auch Informationen zur Qualität eines jeden Nukleotidcalls hinterlegt (*quality scores*). Im Folgenden sind die bei der Auswertung der Daten durchgeführten Arbeitsschritte sowie die verwendeten Programme beschrieben. Außerdem kam Geneious zum Einsatz, ein Programm mit graphischer Oberfläche, das eine Vielzahl bioinformatischer Funktionen bereitstellt.

2.3.2.1 Trimming der Illumina-Reads

Vor ihrer Verwendung in *Mapping*- oder *de novo*-*Assembly*-basierten Anwendungen wurden die Illumina-Rohdaten qualitätsabhängig getrimmt. Dazu wurde Trimmomatic verwendet. Die verwendeten Parameter hingen von der weiteren Verwendung der *Reads* ab. Sollten die *Reads* im Anschluss gegen ein Referenzgenom aligniert werden, wurden die folgenden Parameter verwendet:

```
ILLUMINACLIP: off
SLIDINGWINDOW: 4:15
LEADING: 3
TRAILING: 3
CROP: off
HEADCROP: off
MINLEN: 36
AVGQUAL: off
to PHRED33 conversion: off
to PHRED64 conversion: off
```

Für ein anschließendes *de novo*-*Assembly* fanden hingegen strengere Parameter Anwendung:

```
ILLUMINACLIP: off
MAXINFO: 50:0.8
LEADING: 3
TRAILING: 3
CROP: off
HEADCROP: off
MINLEN: 36
AVGQUAL: off
to PHRED33 conversion: off
to PHRED64 conversion: off
```


2.3.2.2 Mapping der Illumina-Reads und Consensus-Bildung

Für das *Mapping* von Illumina-Reads auf ein Referenzgenom wurde das Programm BWA-SW (Version: 0.7.13-r1126) mit den Standardeinstellungen verwendet. Abweichend davon wurde das *Mapping* im Rahmen des Vergleichs verschiedener DNA-Extraktionskits mit der Version 0.7.12-r1039 durchgeführt. Zudem wurden für dieses Projekt ungetrimmte *Reads* verwendet. Im Anschluss an das *Mapping* wurden die Alignment-Dateien mit SAMtools prozessiert und mithilfe von Varscan wurde eine Consensus-Sequenz erzeugt. Diese Arbeitsschritte wurden mit der von Stephan Fuchs und Matthias Steglich programmierten *seqrec* Pipeline durchgeführt.

Ambiguouscheck

Der Anteil nicht eindeutiger Platzhalter (-, N, R, Y, W, S, M, K, H, B, V, D) einer Nukleotidsequenz wurde mit dem von Matthias Steglich entwickelten Tool *ambiguous_check.sh* bestimmt. Es gibt neben einer Liste der Häufigkeit jedes Platzhalters, den prozentualen Anteil aller mehrdeutigen Platzhalter bezogen auf die Sequenzlänge aus. Isolate mit einem prozentualen Anteil von mehr als 15 % wurden erneut sequenziert bzw. von den phylogenetischen Analysen ausgeschlossen.

Bestimmung von Read- und Insert-Länge

Zur Bestimmung von *Read*- und *Insert*-Länge wurde das freiverfügbare Python-Skript *getinsertsize.py* verwendet (Li, 2015). Das Skript schätzt die durchschnittliche *Insert*-Länge ausgehend von dem Feld TLEN in der übergebenen SAM-Datei.

Bestimmung der normalisierten Coverage

Um die Abdeckung der vier Replikons des *K. pneumoniae*-Isolats 234/12 (Chromosom, 362 kb-Plasmid, 4,8 kb-Plasmid und 3,8 kb-Plasmid) durch *Miseq-Reads* zu bestimmen, wurde zunächst die *Coverage* bestimmt. Dafür wurden die durch ein *Mapping* der *Reads* erhaltenen BAM-Dateien in Geneious (Version 7.1.4) eingeladen und die im *sequence viewer module* angegebenen *Coverage*-Werte übernommen. Für das Chromosom und das 3,8 kb-Plasmid wurde jeweils die *Coverage* für die Bereiche *up*- und *downstream* der IS30-Transposase-Gene bestimmt und daraus, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Länge der Bereiche, der Mittelwert gebildet. Um Unterschiede in der Menge der Rohdaten auszugleichen, wurde die *Coverage* anschließend durch die Summe aller alignierten *Reads* geteilt (Formel 3).

$$(3) \text{ Normalisierte Coverage} = \frac{\text{Coverage entlang des gesamten Replikons}}{\text{Summe aller alignierten Reads}}$$

In der Auswertung wurden alle untersuchten Kits jeweils mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte in Excel über t-Tests mit Bonferroni-Korrektur (globales Signifikanzniveau $\alpha = 0,1$).

Bestimmung der *Coverage* entlang der Replikons

Um die Abdeckung mit *Miseq-Reads* entlang der vier Replikons des *K. pneumoniae*-Isolats 234/12 (Chromosom, 362 kb-Plasmid, 4,8 kb-Plasmid und 3,8 kb-Plasmid) darstellen zu können, wurde ausgehend von den im BAM-Format vorliegenden Dateien mit SAMtools über den Befehl *depth* die *Coverage* für jede Position der Referenzsequenz bestimmt. Anschließend wurden die Mittelwerte für jeweils 100 bp-, 1000 bp- bzw. 10 000 bp-lange Abschnitte bestimmt (Skript *averageCoverage.py*, Stephan Fuchs).

2.3.2.3 *De novo-Assembly*

Das *de novo-Assembly* von *Miseq-Reads* wurde unter Verwendung von A5-miseq unter Standardeinstellungen durchgeführt (Coil et al., 2015).

2.3.3 Typisierung ausgehend von Ganzgenom-Daten

Die Ganzgenom-Daten aller sequenzierten Isolate wurde mithilfe der online verfügbaren *Bacterial Analysis Pipeline* des dänischen *Center for Genomic Epidemiology* ausgewertet (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/cge/>). Das Tool *ResFinder* identifiziert als Teil der Pipeline Resistenzgene (Zankari et al., 2012), während über das Tool *PlasmidFinder* Plasmide, bzw. die vorhandenen Inc-Gruppen, identifiziert werden (Carattoli et al., 2014). Außerdem ist die MLST-Typisierung Teil der Pipeline (Larsen et al., 2012). Da nicht immer alle Allele detektiert wurden (z.B. weil sie auf Contigrenzen lagen), oder die Zuordnung von Allelen aufgrund nicht eindeutiger *Assemblies* nicht möglich war, wurden die Ergebnisse manuell überprüft und falls nötig ergänzt (*Mapping* auf entsprechende Allele, Analyse in Geneious).

Die *wzi*-Allele und die vorhandenen Virulenzgene wurden anhand der Datenbank des Pasteur-Instituts (Frankreich) identifiziert (<http://bigsd.b.pasteur.fr/>). War es nicht möglich eine Gensequenz aus den Ganzgenom-Daten zu bestimmen, wurde das entsprechende Gen per PCR amplifiziert und Sanger-sequenziert (siehe 2.2.7.1).

Einreichen neu identifizierter Allele

Neu identifizierte Allele bzw. neue Sequenztypen (d.h. Allelkombinationen) wurden bei den entsprechenden Datenbanken hinterlegt. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit neu identifizierten Allele bzw. Sequenztypen.

Tabelle 2 Erstmals identifizierte Allele bzw. Allelkombinationen

Allel bzw. Sequenztyp	Zugangsnummer (Datenbank)	Beschreibung
<i>pgi</i> _158, ST2382	4334 (MLST-Datenbank, Pasteur-Institut)	Neues <i>pgi</i> -Allel und neuer Sequenztyp, identifiziert in <i>K. pneumoniae</i> 378/16 (<i>gapA</i> _2, <i>infB</i> _1, <i>mdh</i> _2, <i>pgi</i> _158, <i>phoE</i> _1, <i>rpoB</i> _1, <i>tonB</i> _6)
ST2254	3751 (MLST-Datenbank, Pasteur-Institut)	Neue Kombination bekannter Allele, identifiziert in <i>K. pneumoniae</i> 305/15 (<i>gapA</i> _25, <i>infB</i> _33, <i>mdh</i> _141, <i>pgi</i> _26, <i>phoE</i> _7, <i>rpoB</i> _1, <i>tonB</i> _56)
<i>wzi</i> _553	(<i>wzi</i> -Datenbank, Institut)	Pasteur- Neues <i>wzi</i> -Allel, identifiziert in <i>K. variicola</i> 275/15
<i>wzi</i> _554	(<i>wzi</i> -Datenbank, Institut)	Pasteur- Neues <i>wzi</i> -Allel, identifiziert in <i>K. pneumoniae</i> 303/15
<i>wzi</i> _508	(<i>wzi</i> -Datenbank, Institut)	Pasteur- Neues <i>wzi</i> -Allel, identifiziert in <i>K. variicola</i> 328/15
<i>wzi</i> _555	(<i>wzi</i> -Datenbank, Institut)	Pasteur- Neues <i>wzi</i> -Allel, identifiziert in <i>K. pneumoniae</i> 329/15
<i>wzi</i> _552	(<i>wzi</i> -Datenbank, Institut)	Pasteur- Neues <i>wzi</i> -Allel, identifiziert in <i>K. pneumoniae</i> 334/15
<i>bla</i> _{SHV-196}	KX714286 (NCBI Nucleotide-Datenbank)	Neues SHV-Allel, identifiziert in <i>K. pneumoniae</i> 378/16
<i>bla</i> _{OXA-534}	KX714285 (NCBI Nucleotide-Datenbank)	Neues OXA-Allel, identifiziert in <i>K. pneumoniae</i> 652/15

2.3.4 Genomrekonstruktion aus Ganzgenom-Daten

Im Folgenden sind die Strategien beschrieben, die zur Rekonstruktion von Plasmidsequenzen aus Miseq-Daten und zur Rekonstruktion des gesamten Genoms des Isolats 234/12 aus PacBio- und Miseq-Daten verwendet wurden.

2.3.4.1 Rekonstruktion der Sequenzen des 3,8 kb- und des 4,8 kb-Plasmids des *K. pneumoniae*-Isolats 234/12

Das *K. pneumoniae*-Isolat 234/12 zeigte bei Gelelektrophorese der extrahierten DNA vier Plasmidbanden im Bereich von drei bis mehr als 20 kb. Um die Sequenz dieser Plasmide zu rekonstruieren, wurde Plasmid-DNA isoliert (Plasmid Mini Kit, siehe 2.2.3.6) und Miseq-sequenziert. Die *Reads* wurden zum einen mit BWA-SW gegen die konkatenierte Sequenz aus Chromosom und großem Plasmid, zum anderen in Geneious gegen die Sequenz des großen Plasmids aligniert. Die jeweils nicht alignierten *Reads* wurden anschließend *de novo* assembliert (Geneious Assembler, Medium-Low Sensitivity/Fast, 50 % der Daten). Beide *de novo*-Assemblies ergaben jeweils ein ringgeschlossenes Plasmid. Die rekonstruierten Plasmide besaßen eine Größe von 4,831 bzw. 3,777 kb. Um die Sequenz der Plasmide von Laborseite zu bestätigen, wurden die Plasmide mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und der Ringschluss wurde per PCR überprüft (siehe 2.2.7.3 und 2.2.9).

2.3.4.2 Rekonstruktion der Sequenzen der kleinen Plasmide des Cluster 1-Ausbruchsstamms

Die Mehrheit der zum Cluster 1-gehörenden Ausbruchs isolate zeigte bei Analyse ihrer extrahierten DNA im Agarose-Gel mehrere Plasmidbanden. Um die Sequenz dieser Plasmide zu rekonstruieren, wurde für eines der Isolate (652/15) ein *de novo-Assembly* der *Reads* durchgeführt, die nicht gegen das Referenzgenom aligniert werden konnten (getrimmte *Reads*, *Mapping* in Geneious). Das *Assembly* wurde unter Verwendung des Geneious-Assemblers mit den folgenden Einstellungen ausgeführt: Medium Sensitivity/Fast, 30 % der Daten. Es ergaben sich drei ringgeschlossene Plasmide mit Größen von 3,223 kb, 3,559 kb und 4,160 kb. Die Sequenzen der drei Plasmide finden sich im Anhang.

2.3.4.3 Rekonstruktion der Genomsequenz des Isolats 234/12

Das Genom des *K. pneumoniae*-Isolats 234/12 wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Christoph Eller unter Verwendung verschiedener Sequenziersysteme sequenziert (Eller, 2014). Eine vollständige Rekonstruktion der Genomsequenz war jedoch nicht möglich. Auch eine erneute PacBio-Sequenzierung und ein *de novo-Assembly* mit RS_HGAP_Assembly.2 lieferten weder ein geschlossenes Chromosom, noch ringgeschlossene Plasmide. Sequenziert wurde ein Gemisch aus genomischer DNA (isoliert mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit) und Plasmid-DNA (Miniprep-Kit, 1/10). Die Sequenzierung auf einem PacBio RS II-Gerät wurde von der GATC Biotech AG Konstanz durchgeführt. Die Rohdaten umfassten 53 705 *Reads* mit einer durchschnittlichen Länge von 6,143 kb. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Daten der zweiten PacBio-Sequenzierung neu ausgewertet. Ein *de novo-Assembly* unter Verwendung von RS_HGAP_Assembly.3, der mittlerweile verfügbaren, neueren Version der *Assembly*-Pipeline ergab insgesamt neun Contigs. Zwei der Contigs, die zuvor über Web-BLAST als Plasmid-Contigs identifiziert wurden, zeigten in der Dotplot-Analyse (Geneious Version 7.1.4) einen Ringschluss. Das erste Plasmid besaß eine Größe von 362 kb, das zweite Plasmid war 4,831 kb groß und entsprach in seiner Sequenz dem Plasmid, das auch durch ein *de novo-Assembly* von Miseq-*Reads* rekonstruiert werden konnte (siehe 2.3.4.1). Die Contigs, die über Web-BLAST dem Chromosom zugeordnet werden konnten, wurden anhand des *K. pneumoniae*-Genoms ATCC BAA-2146 (NCBI-Zugangsnummer CP006659) sortiert und überlappende Bereiche nebeneinander liegender Contigs wurden über Alignments identifiziert und entfernt (Geneious). Um die verbliebene Lücke zu schließen, wurden die PacBio-*Reads* gegen die konkatenierten Contigs aligniert (RS BridgeMapper.3) (durchgeführt von Boyke Bunk, Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig). Dabei zeigten sich *Reads*, die diese Lücke überspannten. Die Sequenz des 3,777 kb-Plasmids konnte aus den PacBio-Daten nicht rekonstruiert werden. Durch das *Mapping* von Miseq-*Reads* auf alle vier Replikons wurden mögliche Fehler in den Sequenzen korrigiert (durchgeführt von Boyke Bunk). Die Annotation der Replikons mit Prokka, sowie das Hinterlegen der Genomdaten bei NCBI wurde ebenfalls von Boyke Bunk übernommen.

2.3.5. Phylogenetische Analysen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten phylogenetischen Analysen basieren auf einer *Mapping*-basierten Genomrekonstruktion. Grundlage dieser Auswertung ist die Auswahl eines geeigneten Referenzgenoms. Im Folgenden findet sich eine Beschreibung der Arbeitsschritte, die bei der Erstellung der phylogenetischen Bäume Anwendung fanden.

2.3.5.1 Identifizierung eines geeigneten Referenzgenoms

Um ein passendes Referenzgenom für die *Mapping*-basierten Analysen zu finden, wurde das von Stephan Fuchs entwickelte Tool RefRank verwendet. RefRank wählt das Referenzgenom aus, das die höchste durchschnittliche *Coverage* aufweist. Dafür werden jeweils 10 % der *Reads* aller in die Analyse eingeschlossenen NGS-Datensets gegen alle zur Auswahl stehenden Referenzgenome aligniert. Anschließend wird für jede Kombination aus Isolat und Referenzgenom die *Coverage* des Referenzgenoms berechnet, und davon ausgehend die durchschnittliche *Coverage* jedes Referenzgenoms ermittelt und mittels der Referenzsequenzlänge normalisiert. Eingeschlossen in die Analysen wurden alle zum jeweiligen Zeitpunkt bei NCBI verfügbaren Sequenzen ringgeschlossener Chromosomen der entsprechenden Spezies.

2.3.5.2 Identifizierung repetitiver Bereiche

Repetitive Bereiche, Phagen und Transposasen wurden von der SNP-Analyse ausgeschlossen, weil in diesen Regionen detektierte SNPs unter Umständen fehlerbehaftet sind. So lassen sich nicht-identische Wiederholungen nicht von SNPs unterscheiden, das *Mapping* kurzer *Reads* in repetitiven Bereichen ist nicht zuverlässig und repetitive Regionen können einem anderen Selektionsdruck unterliegen als der Rest des Genoms (Holt et al., 2009). Die entsprechenden Bereiche wurden im jeweiligen Referenzgenom identifiziert und beim anschließenden Filtern der SNPs nicht berücksichtigt. Um repetitive Bereiche zu identifizieren wurde das Repeat Analysis Tool (Kodon) verwendet. Regionen, in denen Phagengene vorkamen, wurden mittels PHASTER bestimmt. Nach Phagen- und Transposase-Genen wurden zudem in den Annotationen des Referenzgenoms gesucht.

2.3.5.3 Filtern von SNPs

Die durch das *Mapping* erhaltenen Consensus-Sequenzen der einzelnen Isolate wurden in Multifasta-Dateien in alignierter Form zusammengefasst. Anschließend wurden alle Positionen, an denen sich die Isolate in ihrer Sequenz unterschieden, herausgefiltert. Positionen, an denen eine oder mehrere Sequenzen kein A, C, G oder T zeigten, wurden nicht berücksichtigt. Das Filtern der SNPs wurde automatisiert mit der von Matthias Steglich und Stephan Fuchs programmierten Pipeline SNPfilter durchgeführt. Über den Parameter --mask wurde der Pipeline eine Liste der Regionen (jeweils Start-

und Endposition) übergeben, die aus der Analyse ausgeschlossen werden sollten (repetitive Bereiche, Transposase- und Phagengene, siehe 2.3.5.2). Ergebnis dieses Schritts war ein Alignment aller SNPs.

2.3.5.4 Berechnung von *Maximum-Likelihood*-Bäumen

Ziel der *Maximum-Likelihood*-Analyse ist es, den phylogenetischen Baum zu identifizieren, der die größte Wahrscheinlichkeit dafür besitzt, dass der vorhandene Datensatz unter dem gewählten evolutionären Modell entstanden ist (Knoop and Müller, 2009a). In dieser Arbeit wurde zur Berechnung von *Maximum-Likelihood*-Bäumen das Programm RAXML verwendet. Ausgehend von den gefilterten SNPs (SNP-Alignment, siehe 2.3.5.3) wurden alle Bäume unter Verwendung des Substitutionsmodells *General Time Reversible* (GTR) unter Annahme einer Gammaverteilung berechnet. Das GTR-Modell gesteht jeder denkbaren Substitution (A-C, A-G, A-T, C-G, C-T und G-T) seine individuelle Wahrscheinlichkeit zu. Die Annahme einer Gamma-Verteilung erlaubt zudem positionsspezifische Substitutionsraten (Knoop and Müller, 2009b). Die Zahl der *starting trees* lag für den im Rahmen der Ausbruchsanalyse berechneten Baum und den Baum der Carbapenemase-produzierenden Isolate bei 100. Aufgrund des enormen Rechenaufwands wurde die Zahl der *starting trees* für den 337 *K. pneumoniae*-Isolate-umfassenden Baum auf 10 reduziert. Um die Verlässlichkeit der Knoten zu schätzen wurden jeweils 100 *Bootstraps* berechnet.

2.3.5.5 Erstellen artifizieller *Reads*

Um Ganzgenom-sequenzierte Isolate, deren Genomsequenzen in öffentlichen Datenbanken hinterlegt wurden, in die Baumberechnung miteinbeziehen zu können, wurden ausgehend von der publizierten Sequenz, artifizielle *Miseq-Reads* (FASTQ) erzeugt. Dies erfolgte mithilfe des Tools ART unter Verwendung des folgenden Befehls:

```
art_Illumina -ss MSv3 -i Referenz.fasta -l 250 -p -m 600 -f 100 -s 300 -o NameOutput
```

Erläuterung der verwendeten Parameter:

-ss	Sequenziersystem, MSv3 steht für MiSeq v3 (250 bp)
-i	Name der <i>Input</i> -Datei
-l	<i>Read</i> -Länge in Basenpaaren
-p	Simulation von <i>paired-end-Reads</i>
-m	durchschnittliche Fragmentgröße in Basenpaaren
-f	<i>Coverage</i> (verwendet wurde 100× oder 50×)
-s	Standardabweichung der Fragmentgröße
-o	Name der <i>Output</i> -Datei

Die so erhalten *Reads* wurden wie die *Reads* der Illumina-sequenzierten Isolate mit BWA-SW gegen die entsprechende Referenzsequenz aligniert.

2.3.6 Cluster 1-spezifische Multiplex-PCR – Primerdesign

Im Rahmen der Ausbruchsanalyse wurde zur schnellen Identifizierung von Isolaten, die zum Ausbruchcluster 1 gehören, eine Multiplex-PCR entwickelt. Die PCR sollte auf drei Primerpaaren basieren, deren Zielregionen in der Kombination spezifisch für den Ausbruchstamm sind. Im Folgenden wird das Vorgehen bei der Auswahl der Zielregionen beschrieben. In die Entwicklung der PCR eingeschlossen wurden die ersten 38 sequenzierten Isolate, von denen 27 zu Cluster 1 gehörten. Teil der PCR sollten diese drei Regionen werden:

- (I) Eine möglichst ST15-spezifische Region
- (II) Eine Cluster 1-spezifische Region
- (III) Eine einzigartige Region innerhalb des 4,160 kb-Plasmids

Um eine ST15-spezifische Region zu identifizieren, wurde nach Genomabschnitten in der Referenzsequenz (NZ_CP008929, ST15) gesucht, die in allen Cluster 1-Isolaten, aber in keinem der anderen Isolate, vorhanden, also durch alignierte *Reads* abgedeckt, waren. Auf diese Weise identifizierte Regionen wurden durch BLAST-Suchen auf ein Vorkommen in anderen *K. pneumoniae*-Sequenztypen untersucht (web BLAST, *nucleotide collection*, März 2016) (Altschul et al., 1990). Das Produkt des ersten Primerpaars (hem-F/-R) zeigte keine Treffer in anderen *K. pneumoniae*-Isolaten als der Referenz. Die Primer binden *upstream* bzw. innerhalb des Gens codierend für das *hemolysin secretion/activation protein* (locus tag PMK1_RS11760). Um eine Cluster 1-spezifische Region zu identifizieren, wurden die *Reads* des Cluster 1-Isolats 652/15, die nicht gegen die Referenzsequenz aligniert werden konnten, *de novo* assembliert (Geneious Assembler, 30 % der Daten). Die entstandenen Contigs wurden durch BLAST-Suchen auf ein Vorkommen in anderen *Klebsiella*-Isolaten und in Plasmidsequenzen untersucht. Das Primerpaar (unique-F/R) amplifiziert einen Teil eines Contigs, das weder Treffer in anderen *Klebsiella*-Isolaten, noch in Plasmiden zeigte. Durch das *de novo-Assembly* der nicht alignierten *Reads* konnte auch die Sequenz drei kleiner Plasmide rekonstruiert werden (siehe 2.3.4.2). Innerhalb des 4,160 kb-Plasmids zeigte sich ein Bereich, der in der BLAST-Suche keinerlei Treffer zeigte. Das dritte Primerpaar (4,160 kb-F/-R) amplifiziert einen Teil dieses Bereichs.

3 Ergebnisse

3.1 Rekonstruktion der Genomsequenz und Charakterisierung des *K. pneumoniae*-Isolats 234/12

3.1.1 Hintergrund

Das *K. pneumoniae*-Isolat 234/12 stammt aus einem Ausbruchsgeschehen auf einer neonatologischen Station und wurde im Jahr 2011 aus einer Blutkultur isoliert (Haller et al., 2015). Im Rahmen der Ausbruchsanalyse und der Doktorarbeit von Christoph Eller wurde dieses Isolat phänotypisch charakterisiert und sein Genom unter Einsatz verschiedener Sequenziermethoden sequenziert. Das Isolat wurde zu Beginn des Ausbruchs isoliert und die Genomsequenz sollte als Referenz für phylogenetische Analysen dienen. In der PFGE mit S1-Nuklease-Verdau zeigte sich ein einziges, sehr großes Plasmid (ca. 360 kb). Durch Konjugation sowie durch Hybridisierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass das für den ESBL-Phänotyp verantwortliche Beta-Laktamase-Gen *bla*_{CTX-M-15} auf diesem Plasmid lokalisiert ist (Haller et al., 2015). Da die Rekonstruktion der vollständigen Genomsequenz aus den vorhandenen Sequenzdaten nicht möglich war, wurde eine erneute PacBio-Sequenzierung durchgeführt. Diese führte zwar zu einer deutlichen Reduktion der Contigzahl (14 Contigs nach *de novo-Assembly* mit HGAP.2 gegenüber 91 Contigs aus den vorangegangenen Sequenzierungen), durchgehende Sequenzen für Chromosom und Plasmid konnten jedoch auch hier nicht erreicht werden (Eller, 2014).

Um für den anschließend geplanten Vergleich verschiedener DNA-Extraktionsmethoden eine möglichst vollständige Referenzsequenz zur Verfügung zu haben, wurden die Daten aus der zweiten PacBio-Sequenzierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu ausgewertet.

3.1.2 Rekonstruktion der Genomsequenz

Aus den PacBio-Daten ließen sich unter Verwendung des Assemblers HGAP.3 insgesamt 9 Contigs und ausgehend davon die ringgeschlossenen Sequenzen des Chromosoms, eines 362 kb-großen Plasmids und eines 4,8 kb-großen Plasmids rekonstruieren (siehe 3.5.3). Die Auftrennung extrahierter Plasmid-DNA im Agarosegel wies auf das Vorhandensein eines zweiten kleinen Plasmids hin. Die Sequenz dieses 3,8 kb-großen Plasmids konnte durch ein *de novo-Assembly* aus Illumina-Miseq-Daten rekonstruiert werden.

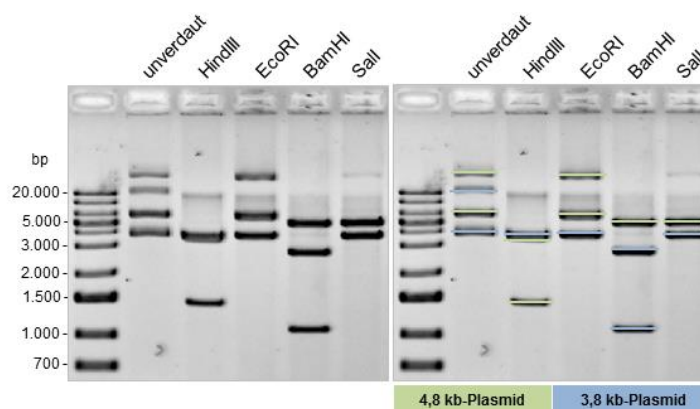


Abbildung 4 Gelelektrophorese der mit Restriktionsenzymen verdauten Plasmid-DNA des Isolats 234/12

Gezeigt ist die Auftrennung der unverdauten (Spur 2) bzw. mit Restriktionsenzymen verdauten (Spur 3 - 6) Plasmid-DNA des Isolats 234/12 im Agarosegel. Der rechte Teil der Abbildung zeigt zusätzlich die theoretisch erwarteten Banden nach Verdau mit dem entsprechenden Enzym für das 4,8 kb-Plasmid (grün) und das 3,8 kb-Plasmid (blau). Im unverdauten Zustand zeigten sich für jedes Plasmid zwei Banden, die untere entspricht der *super-coiled*-Form, die obere der *nicked*- bzw. *open-circular*-Form. Errechnete Fragmentgrößen: HindIII: 1380 bp/3451 bp (4,8 kb-Plasmid) und 3777 bp (3,8 kb-Plasmid), EcoRI: unverdaut (4,8 kb-Plasmid) und 3777 bp (3,8 kb-Plasmid), BamHI: 4831 bp (4,8 kb-Plasmid) und 1044 bp/2733 bp (3,8 kb-Plasmid), Sall: 4831 bp (4,8 kb-Plasmid) und 3777 bp (3,8 kb-Plasmid).

Die Sequenzen der beiden kleinen Plasmide wurden durch den Verdau mit Restriktionsenzymen bestätigt. In der Gelelektrophorese zeigten die verdauten Plasmide Fragmente der erwarteten Größe (Abbildung 4). Weiterhin konnte der Ringschluss der beiden kleinen Plasmide per PCR bestätigt werden. Die Eigenschaften der rekonstruierten Replikons sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Das Chromosom besaß eine Größe von 5 278 254 bp und einen G/C-Gehalt von 57,4 %. Der G/C-Gehalt der Plasmide lag mit 43-48 % unter dem G/C-Gehalt des Chromosoms. Die Genomsequenzen wurden annotiert und bei NCBI hinterlegt.

Tabelle 3 Eigenschaften von Chromosom und Plasmiden des Isolats 234/12

Replikon	Größe [bp]	G/C-Gehalt	NCBI-Zugangsnummer
Chromosom	5 278 254	57,4 %	CP011313
362 kb-Plasmid	361 964	48,0 %	CP011314
4,8 kb-Plasmid	4 831	43,1 %	CP011315
3,8 kb-Plasmid	3 777	45,2 %	CP011316

Die MLST-Typisierung ausgehend von der neu rekonstruierten Sequenz bestätigte die Zugehörigkeit des Isolats zum Sequenztyp ST514. Aufgrund der Größe der Fragmente nach einem *in silico*-Verdau des *gyrA*-Gens ließ sich das Isolat 234/12 der Phylogruppe KpI bzw. der Spezies *K. pneumoniae* zuordnen. Die *wzi*-Typisierung ergab das Allel *wzi*_433.

3.1.3 Gehalt an Antibiotika-Resistenzgenen

Im Chromosom konnten neben dem Beta-Laktamase-Gen *bla*_{SHV-63}, die beiden Chinolon-Resistenz-vermittelnden Gene *oqx*A und *oqx*B nachgewiesen werden. Das 362 kb-Plasmid codierte für insgesamt 12 Antibiotikaresistenzgene (Tabelle 4), deren Produkte Resistenzen gegenüber Aminoglykosiden, Fluorchinolonen, Beta-Laktamen, Phenicolen, Sulfonamiden, Tetrazyklinen und Trimethoprim vermitteln. Das Gen *aac*(3)-*Ila* lag in zwei Kopien vor. Diese unterschieden sich in zwei Nukleotiden, besaßen aber eine identische Aminosäuresequenz.

Tabelle 4 Mittels ResFinder identifizierte Antibiotika-Resistenzgene im 362 kb-Plasmid

Resistenzgen	Position	Phänotyp	NCBI-Zugangsnummer der Referenzsequenz
<i>aac</i> (3)- <i>Ila</i>	292 465 – 293 325	Aminoglykosidresistenz	X51534
<i>aac</i> (3)- <i>Ila</i>	311 256 – 312 116	Aminoglykosidresistenz	X51534
<i>aac</i> (6') <i>Ib-cr</i>	314 520 – 315 119	Fluorquinolon- und Aminoglykosidresistenz	DQ303918
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	305 227 – 306 102	Beta-Laktamresistenz	DQ302097
<i>bla</i> _{OXA-1}	313 559 – 314 389	Beta-Laktamresistenz	J02967
<i>bla</i> _{TEM-1B}	291 463 – 292 323	Beta-Laktamresistenz	JF910132
<i>cat</i> A1	70 799 – 71 458	Phenicolresistenz	V00622
<i>dfr</i> A1	168 309 – 168 782	Trimethoprimresistenz	X00926
<i>str</i> A	60 367 – 61 170	Aminoglykosidresistenz	AF321551
<i>str</i> B	61 170 – 62 006	Aminoglykosidresistenz	M96392
<i>sul</i> 2	59 491 – 60 306	Sulfonamidresistenz	HQ840942
<i>tet</i> (A)	318 574 – 319 773	Tetracyclinresistenz	AJ517790

3.1.4 Replikontypen der Plasmide

In der Sequenz des 362 kb-Plasmids konnten drei verschiedene *rep*-Gene detektiert werden, die zur Bestimmung der Inc-Gruppe von Plasmiden verwendet werden (Tabelle 5). Bei dem 362 kb-Plasmid handelte es sich demnach um ein Multireplikonplasmid mit Plasmidreplikons der Typen FIB, HI1B und Q1. Die beiden kleinen Plasmide codierten für die replikationsassoziierte RNA1. Weitere

replikationsassoziierte Gene wurden nicht detektiert und so konnten die beiden Plasmide keinem bekannten Replikontypen zugeordnet werden.

Tabelle 5 Mittels PlasmidFinder identifizierte *rep*-Gene im 362 kb-Plasmid

Plasmidreplikon	Position	Referenz (NCBI-Zugangsnummer)
IncFIB(Mar)	190 074 – 190 512	JN420336
IncHI1B	303 159 – 303 728	JN420336
IncQ1	57 703 – 58 152	HE654726

3.1.5 Gehalt an Virulenzgenen

Im Chromosom des Isolats 234/12 konnten durch Abgleich mit der Virulenzgen-Datenbank des Pasteur-Instituts die folgenden virulenzassoziierten Gene nachgewiesen werden: (I) die für die Ausbildung von Typ 3-Fimbrien verantwortlichen Gene *mrkA*, *mrkB*, *mrkC*, *mrkD*, *mrkF*, *mrkH*, *mrkI* und *mrkJ*, sowie (II) die für ein Eisenaufnahme-System codierenden Gene *kfuA*, *kfuB* und *kfuC*.

3.2 Vergleich von DNA-Extraktionskits zur Extraktion von bakterieller DNA für die Miseq-Sequenzierung

3.2.1 Hintergrund

Extrahierte DNA, die in hoher Qualität und ausreichender Menge vorliegt, bildet das Ausgangsmaterial für eine erfolgreiche Sequenzierung. Zur DNA-Extraktion werden häufig kommerziell erhältliche Kits verwendet. Viele *K. pneumoniae*-Isolate besitzen, neben ihrem Chromosom, Plasmide unterschiedlicher Größe. Chromosomale DNA und Plasmid-DNA können sich in ihren Eigenschaften, wie Größe, Konformation und G/C-Gehalt unterscheiden. Um zu untersuchen, inwieweit die erfolgreiche Sequenzierung von sowohl chromosomaler DNA, als auch Plasmid-DNA von der Wahl des DNA-Extraktionskits abhängt, wurden auf verschiedenen Prinzipien beruhende DNA-Extraktionskits verglichen. Dabei wurden die folgenden Parameter beurteilt: (I) Zeitaufwand und Kosten, (II) Qualität und Menge der extrahierten DNA, (III) Qualität der *Libraries* und (IV) *Coverage* der verschiedenen Replikons. Durchgeführt wurden die Experimente mit dem *K. pneumoniae*-Isolat 234/12, dessen Ganzgenom-Sequenz im Rahmen des ersten Teilprojekts rekonstruiert wurde (siehe 3.1). Dieses Isolat wurde ausgewählt, weil es insgesamt drei Plasmide unterschiedlicher Größe (362 kb, 4,8 kb und 3,8 kb) besitzt und so der mögliche Einfluss der Plasmidgröße untersucht werden konnte. Die Extraktion der DNA mit den verschiedenen Kits erfolgte jeweils aus derselben Flüssigkultur.

3.2.2 Eigenschaften der DNA-Extraktionskits

In den Vergleich wurden die folgenden sechs kommerziell erhältlichen Kits eingeschlossen: Genomic-tip 20/G, MagAttract HMW DNA Kit, MasterPure DNA Purification Kit, Wizard Genomic DNA Purification Kit, DNeasy Blood & Tissue Kit und das Plasmid Mini Kit. Das DNeasy Blood & Tissue Kit wird im Fachgebiet 13 des RKIs routinemäßig zur DNA-Extraktion für die anschließende Miseq-Sequenzierung eingesetzt. Es wurde daher als Referenzmethode in den Vergleich miteingeschlossen. Bei einem der Kits (Plasmid Mini Kit) handelt es sich um ein Kit zur Extraktion von Plasmid-DNA. Die Plasmid-DNA wurde nicht allein sequenziert, sondern mit DNA, die mit dem DNeasy Blood & Tissue-Kit isoliert wurde, gemischt (1/10 Plasmid-DNA, 9/10 DNeasy-DNA). Die verwendeten Kits basieren auf unterschiedlichen Methoden. Zwei der Kits verwenden Silica als DNA-bindendes Material. Das DNeasy Blood & Tissue Kit verwendet Säulen, die eine Silicamembran enthalten, während das MagAttract HMW DNA Kit magnetische *Beads*, die mit einer Silicaschicht ummantelt sind, verwendet. Sowohl das Genomic-tip-Kit, als auch das Plasmid Mini-Kit basieren auf Anionenaustauscher-Säulen. Dabei führt beim Plasmid Mini-Kit eine alkalische Lyse zum Ausschluss genomischer DNA. Die letzten beiden Kits (MasterPure DNA Purification Kit und Wizard Genomic DNA Purification Kit) kommen ohne DNA-bindende Materialien aus. Sie basieren auf *Salting-out*-Protokollen. Die Eigenschaften der sechs Kits sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6 Eigenschaften der DNA-Extraktionskits

Extraktionskit Herstellerbezeichnung	Hersteller	Prinzip	Kosten pro Extraktion* [€]	Zeitaufwand** (Hands-on-time)	Zellzahl	Ausbeute [µg] (SD)	Reinheit [A260/280] (SD)
Genomic-tip 20/G	Qiagen	Anionenaustauscher-Säulen	8,1	8 h (45 min)	4×10^9	9,8 (3,5)	1,77 (0,06)
MagAttract HMW DNA Kit	Qiagen	Magnetische <i>Beads</i> , Silica-ummantelt	4,4	2 h 40 min (1 h)	2×10^9	10,3 (6,6)	1,83 (0,05)
MasterPure DNA Purification Kit	Epicentre	<i>Salting-out</i>	1,1	2 h 10 min (35 min)	0.4×10^9	3,3 (1,0)	1,82 (0,03)
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega	<i>Salting-out</i>	2,0	3 h (35 min)	4×10^9	18,1 (7,5)	1,58 (0,01)
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen	Silica-Säulen (Zentrifugation)	3,2	3 h (45 min)	2×10^9	10,9 (1,3)	1,72 (0,05)
Plasmid Mini Kit	Qiagen	Alkalische Lyse, Anionenaustauscher-Säulen	5,2	3 h 50 min (40 min)	18×10^9	0,5 (0,2)	1,67 (0,03)

* Listenpreis auf der Internetseite des Herstellers im Juli 2015

** Zeit, die für die DNA-Extraktion aus drei Proben benötigt wird

SD: Standardabweichung basierend auf drei unabhängigen DNA-Extraktionen

Die Kosten pro DNA-Extraktion lagen je nach Kit zwischen 1,10 € und 8,10 €. Am preisgünstigen waren die beiden *Salting-out*-basierten Kits, am preisintensivsten das Anionenaustauscher-basierte Genomic-tip-Kit. Auch wenn sich die reine Arbeitszeit (*Hands-on-time*) zwischen den Kits nur wenig unterschied (35 min bis 1 h für drei parallele Extraktionen), bewirkten die Inkubationszeiten in den jeweiligen Protokollen erhebliche Unterschiede im Zeitaufwand (2 h 10 min bis 8 h).

3.2.3 Einfluss des Extraktionskits auf die Qualität der DNA

Die Konzentration der extrahierten DNA wurde fluorometrisch bestimmt und ausgehend davon wurde die Ausbeute berechnet. Für die *Library*-Herstellung mit dem NexteraXT-Kit wird nur 1 ng DNA benötigt, sodass auch die Kits mit der geringsten durchschnittlichen Ausbeute (Plasmid Mini Kit und MasterPure DNA Purification Kit mit 0,5 µg bzw. 3,3 µg) deutlich über der benötigten Menge lagen. Als Parameter für die Reinheit der extrahierten DNA wurden die A260/280-Verhältnisse photometrisch bestimmt und verglichen. Die DNA extrahiert mit dem Wizard Genomic DNA Purification Kit, dem DNeasy Blood & Tissue Kit und dem Plasmid Mini Kit lieferte Werte außerhalb des von Illumina empfohlenen Rahmens von 1,8 - 2,0 (siehe Tabelle 6). Um Aussagen über die Fragmentgrößen der extrahierten DNA treffen zu können, wurde die DNA im Agarosegel aufgetrennt. Da sich in der herkömmlichen Gel-Elektrophorese nur eine unzureichende Auftrennung zeigte, wurde eine PFGE durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 dargestellt. Die größten DNA-Fragmente lieferten das MagAttract HMW DNA Kit und das Genomic-tip Kit. Hier zeigten sich Fragmente mit Größen von bis zu 300 kb. Eine Bande auf Höhe des 362 kb-Plasmids zeigte sich für keines der Kits. Hingegen waren Banden für die beiden kleinen Plasmide mit allen Kits, außer den beiden *Salting-out*-basierten, im Gel sichtbar.

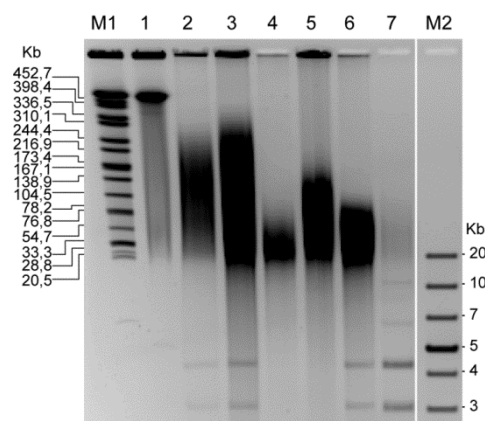


Abbildung 5 Puls-Feld-Gelelektrophorese extrahierter DNA

Gezeigt ist die Auftrennung extrahierter DNA des Isolats 234/12 im Puls-Feld-Gel. Aufgetragen wurden je 10 µl der mit dem jeweiligen Kit extrahierten DNA (Spur 2-7). M1: Größenstandard *Salmonella Braenderup* im Agaroseblöckchen, lysiert und mit XbaI verdaut; 1 *K. pneumoniae* 234-12 im Agaroseblöckchen, lysiert und mit S1-Nuklease verdaut (zur Darstellung des 362 kb-Plasmids); 2 Genomic-tip 20/G; 3 MagAttract HMW DNA Kit; 4 MasterPure DNA Purification Kit; 5 Wizard Genomic DNA Purification Kit; 6 DNeasy Blood & Tissue Kit; 7 Plasmid Mini Kit; M2 1 kb Plus DNA Ladder.

3.2.4 Einfluss der Extraktionskits auf Qualität der *Libraries*

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses des DNA-Extraktionskits auf die Qualität der *Libraries* wurden die erhaltenen Miseq-Rohdaten hinsichtlich *Read*- und *Insert*-Länge charakterisiert. Die *Insert*-Länge (*insert size*, auch *read span*) entspricht der Länge des DNA-Fragments, das zwischen den zur Sequenzierung angefügten Adaptoren liegt. Wie in Abbildung 6 dargestellt, zeigte keines der Kits einen signifikanten Unterschied hinsichtlich *Read*- und *Insert*-Länge im Vergleich zum DNeasy Blood & Tissue Kit. Die durchschnittliche *Read*-Länge war mit allen Kits deutlich kürzer als die in der Miseq-Sequenzierung angestrebten 300 Basenpaare. Außerdem unterschieden sich *Read*- und *Insert*-Länge unabhängig vom verwendeten Kit kaum.

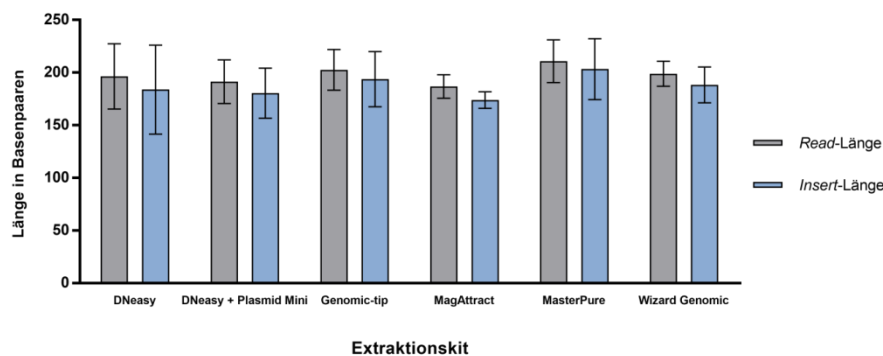


Abbildung 6 Einfluss des Extraktionskits auf *Read*- und *Insert*-Länge

Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung für *Read*- und *Insert*-Länge aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). Sowohl *Read*-, als auch *Insert*-Länge wurden nach *Mapping* auf die Referenzsequenz mit dem Skript *getinsertsize.py* bestimmt.

Auskunft über die Qualität der Miseq-*Reads* geben auch die sogenannten Qualitätswerte (*quality scores*). Die Qualitätswerte geben die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass eine Base im Rahmen der Sequenzierung korrekt bestimmt wurde. So entspricht der Wert Q20 einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1 zu 100 und ein Q30-Wert einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1 zu 1000. Der Anteil von Basen mit einem Qualitätswert von mindestens 20 (Q20) bzw. 30 (Q30) unterschied sich für keines der Kits signifikant von dem jeweiligen Anteil bei Verwendung des DNeasy Blood & Tissue Kits (siehe Abbildung 7).

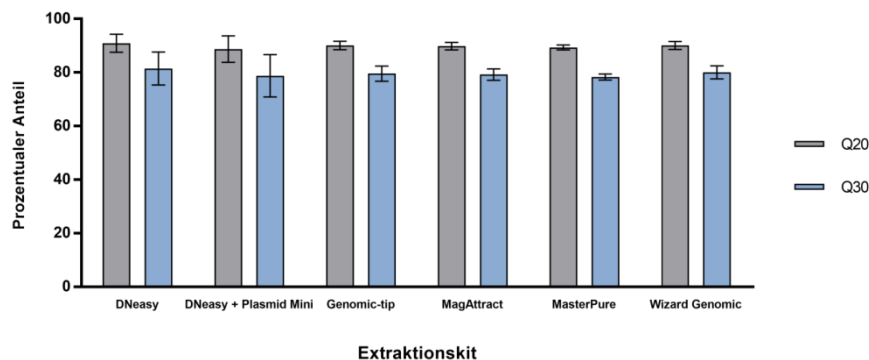


Abbildung 7 Einfluss des DNA-Extraktionskits auf die Qualitätswerte Q20 und Q30

Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Basen mit einem Qualitätswert von mindestens 20 bzw. 30. Gezeigt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$).

3.2.5 Einfluss des DNA-Extraktionskits auf die Coverage von Chromosom und Plasmiden

Die (*Sequencing*) *Coverage* gibt die Abdeckung eines DNA-Abschnitts durch *Reads* an. Um beim Vergleich der *Coverage* Unterschiede in der Menge an Rohdaten auszugleichen, wurde die *Coverage* jedes Replikons durch die Summe aller alignierten *Reads* geteilt (= normalisierte *Coverage*). Die normalisierte *Coverage* des Chromosoms lag für alle Kits zwischen 29- und 39-fach, die des 362 kb-Plasmids zwischen 39- und 56-fach (siehe Abbildung 8). Hinsichtlich der *Coverage* von Chromosom und 362 kb-Plasmid unterschied sich keines der Kits signifikant vom DNeasy Blood & Tissue Kit. Die *Coverage* der kleinen Plasmide war in allen Fällen höher als die *Coverage* von Chromosom und 362 kb-Plasmid. So lag für die Matrix-basierten Kits die *Coverage* des 4,8 kb-Plasmids zwischen 33- und 47-mal höher und die des 3,8 kb-Plasmids zwischen 39- und 66-fach höher als die des Chromosoms. Bei Verwendung der beiden *Salting-out*-Kits war die *Coverage* der Plasmide nur 2,6- und 4,4-fach (4,8 kb-Plasmid) bzw. 3,2- und 4,9-fach höher (3,8 kb-Plasmid) als die *Coverage* des Chromosoms.

Die beiden kleinen Plasmide wiesen bei Extraktion mit den beiden *Salting-out*-basierten Kits (Masterpure und Genomic Wizard) eine signifikant niedrigere *Coverage* im Vergleich zum DNeasy Blood & Tissue Kit auf ($p < 0,02$). Die Anreicherung der DNeasy-DNA mit Plasmid-DNA (DNeasy + Plasmid Mini) bewirkte einen signifikanten Anstieg der *Coverage* der beiden kleinen Plasmide ($p < 0,02$). Alle anderen Kits zeigten keinen Unterschied in der *Coverage* der beiden kleinen Plasmide im Vergleich zum DNeasy Blood & Tissue Kit.

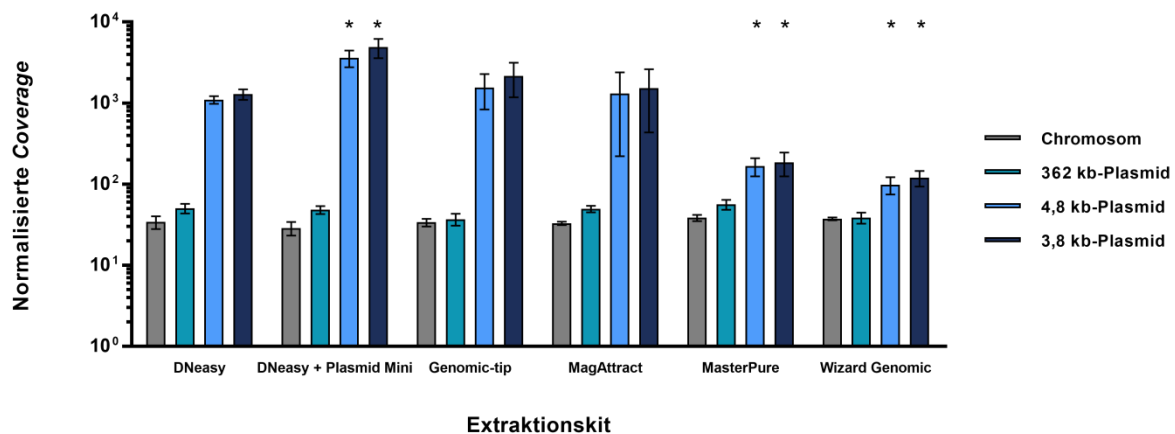


Abbildung 8 Einfluss des DNA-Extraktionskits auf die Coverage von Chromosom und Plasmiden

Dargestellt ist die normalisierte *Coverage* (= *Coverage*/Summe aller alignierten *Reads*) für die vier Replikons Chromosom, 362 kb-Plasmid, 4,8 kb-Plasmid und 3,8 kb-Plasmid bei Extraktion mit dem jeweiligen Kit. Gezeigt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zum DNeasy Blood & Tissue Kit sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet ($p < 0,02$, zweiseitiger t-Test mit Bonferroni-Korrektur, $\alpha = 0,10$).

3.2.6 Coverage entlang der Replikons

Die Verteilung der *Reads* zeigte sich weitestgehend unbeeinflusst von der Wahl des Extraktionskits (siehe Abbildung 9). Unabhängig vom verwendeten Extraktionskit zeigten sich keine Bereiche, die nicht von *Reads* abgedeckt waren. Für zwei Regionen des Chromosoms zeigte sich mit allen Kits, außer dem MasterPure und dem Wizard Genomic Kit, eine höhere *Coverage* als im restlichen Chromosom (Abbildung 9, rote Pfeile). Gleichzeitig zeigte sich im 3,8 kb-Plasmid ein Bereich, der eine niedrigere Coverage aufwies als der Rest des Plasmids. Die Analyse dieser Bereiche zeigte das mehrfache Vorhandensein eines identischen Transposase-Gens. Dieses lag in zwei Kopien im Chromosom und in einer Kopie im 3,8 kb-Plasmid vor.

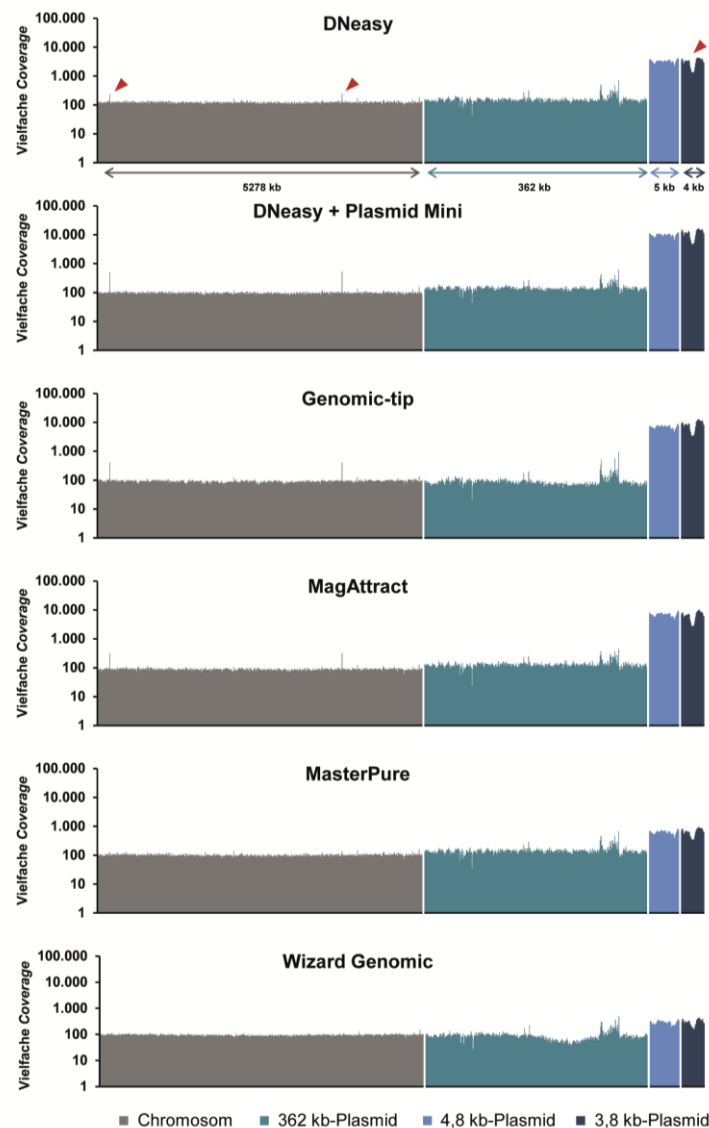


Abbildung 9 Coverage entlang der Replikons

Dargestellt ist die Verteilung der alignierten *Reads* über die Replikons. Ein Balken entspricht der durchschnittlichen *Coverage* von 10 000 Nukleotiden (Chromosom), 1 000 Nukleotiden (362 kb-Plasmid) bzw. 100 Nukleotiden (4,8 kb- und 3,8 kb-Plasmid). Die Regionen, die das Transposase-Gen enthalten, das sowohl im Chromosom, als auch im 3,8 kb-Plasmid vorkommt, sind durch rote Pfeile gekennzeichnet.

3.2.7 Bestimmung der Plasmidkopiezahl über qPCR und Coverage

Der Unterschied in der *Coverage* der beiden kleinen Plasmide zwischen dem DNeasy Blood & Tissue Kit und den beiden *Salting-out*-basierten Kits Masterpure und Wizard Genomic (siehe 3.2.5) warf die Frage auf, ob der beobachtete Unterschied auf eine An- bzw. Abreicherung von Plasmid-DNA mit dem jeweiligen Kit zurückzuführen war und damit die Frage nach der tatsächlichen Kopiezahl der Plasmide. Um diese Fragen zu beantworten, wurde über qPCRs das Mengenverhältnis des Chromosoms zu den drei Plasmiden bestimmt. Eine Methode der DNA-Extraktion mit einem Minimum an Arbeitsschritten, die Einfluss auf das Mengenverhältnis von Chromosom und Plasmiden nehmen könnten, ist die Herstellung von Koch-DNA. Sie basiert auf der Lyse von Bakterien durch Inkubation bei 96 °C mit anschließendem Abzentrifugieren der Zelltrümmer. Koch-DNA wurde daher als Referenz in die qPCR-Experimente eingeschlossen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Die Kopiezahlen des 3,8 kb- und des 4,8 kb-Plasmids lagen für die Koch-DNA etwa zwei- bis dreifach über der Kopiezahl des Chromosoms. Die durchschnittlichen Kopiezahlen der beiden kleinen Plasmide waren bei Extraktion der DNA mit dem DNeasy Blood & Tissue-Kit, dem MagAttract-Kit und dem Genomic-tip-Kit höher als bei der Koch-DNA. So war beispielsweise bei Verwendung des Genomic-tip-Kits die durchschnittliche Kopiezahl des 3,8 kb-Plasmids dreimal so hoch und die des 4,8 kb-Plasmids neunmal so hoch wie die des Chromosoms. Allerdings zeigten sich relativ hohe Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten. In der DNA, die mit dem Masterpure bzw. Wizard Genomic-Kit extrahiert wurde, lag die Kopiezahl der zwei kleinen Plasmide unter den Werten, die sich für die Koch-DNA ergaben.

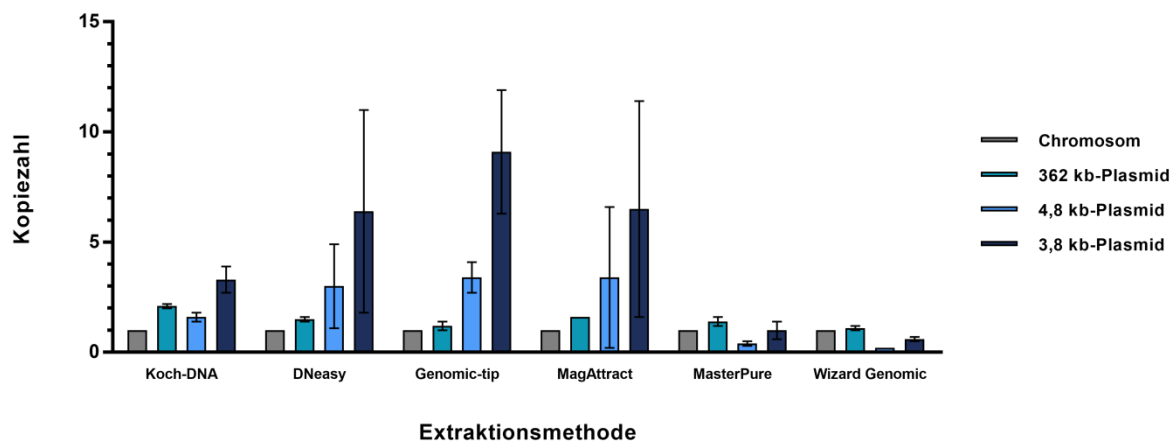


Abbildung 10 Kopiezahl der Plasmide bestimmt über qPCR

Dargestellt sind die über qPCR bestimmten Plasmidkopiezahlen in der extrahierten DNA. Gezeigt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$).

Zur Berechnung der Plasmidkopiezahl aus der *Coverage* wurde die normalisierte *Coverage* des jeweiligen Plasmids durch die normalisierte *Coverage* des Chromosoms geteilt. Während sich die Kopiezahlen des 362 kb-Plasmids bei Berechnung auf Grundlage der qPCR-Experimente und auf

Grundlage der *Coverage* sehr ähnlich waren, lagen die im qPCR-Experiment bestimmten Kopiezahlen der beiden kleinen Plasmide unter den Werten, die sich bei Berechnung der Kopiezahl ausgehend von der *Coverage* ergaben. So lag die auf Grundlage der *Coverage* berechnete Kopiezahl für das 4,8 kb-Plasmid im Durchschnitt 12-mal höher und für das 3,8 kb-Plasmid im Durchschnitt sechsmal höher als die in der qPCR bestimmte Kopiezahl.

3.3 Genomische Diversität Carbapenemase-produzierender *K. pneumoniae* in Deutschland

3.3.1 Hintergrund und Auswahl der Isolate

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 107 Carbapenemase-produzierende *Klebsiella*-Isolate Ganzgenom-sequenziert. Ziel war eine umfassende Beschreibung der in Deutschland vorhandenen Population Carbapenemase-produzierender *K. pneumoniae*. Die gewonnenen Daten sollten als Grundlage für zukünftige Ausbruchsanalysen dienen und eine schnelle Einordnung von Ausbruchsstämmen ermöglichen. Die sequenzierten Isolate wurden hinsichtlich der folgenden Eigenschaften charakterisiert: (I) Sequenztyp (MLST), (II) Besitz von Beta-Laktamase- und Virulenzgenen, (III) Kapseltyp (*wzi*-Typisierung) und (IV) Plasmidgehalt. Außerdem wurden die Ganzgenom-Daten genutzt, um die phylogenetische Verwandtschaft der Isolate zu untersuchen. So wurde ein Stammbaum für alle sequenzierten Isolate berechnet. Um die in Deutschland auftretenden *K. pneumoniae*-Isolate international einordnen zu können, wurde anschließend ein Stammbaum erstellt, der auch die öffentlich verfügbaren Genomdaten von 238 internationalen Isolaten miteinschloss.

Die sequenzierten Isolate stammten aus den Jahren 2008 bis 2014. Eingeschlossen in die Analyse wurden Isolate, die eine der vier in Deutschland am häufigsten auftretenden Carbapenemasen produzierten (KPC-2, KPC-3, OXA-48 oder NDM-1). Um ein möglichst repräsentatives Bild zu erhalten, wurden aus den Einsendungen an das RKI Wernigerode und an das NRZ für gramnegative Krankenhausreger Isolate ausgewählt, die die Häufigkeit der einzelnen Carbapenemasen, sowie die Verteilung der Bundesländer unter den Einsendungen widerspiegeln. Die geografische Herkunft der ausgewählten Isolate ist in Abbildung 11 dargestellt.

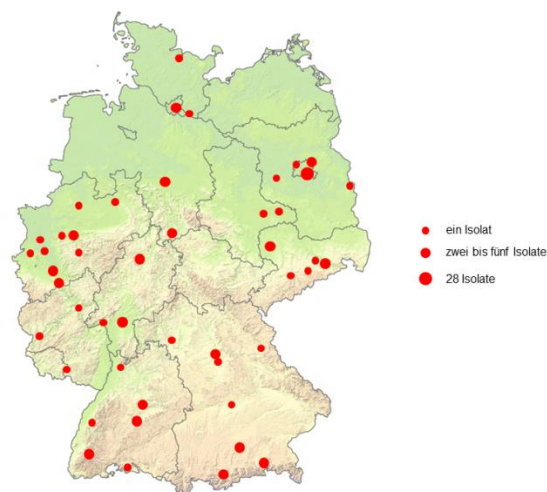


Abbildung 11 Herkunft der sequenzierten Carbapenemase-produzierenden Isolate

Dargestellt sind die Orte, an denen die untersuchten Isolate isoliert wurden. Die Herkunft von vier Isolaten aus Sachsen ist nicht dargestellt, da hier keine Ortsangabe vorlag. Die Kreisgröße gibt die Anzahl der Isolate aus dem jeweiligen Ort an (siehe Legende).

Hintergrundkarte: © Bundesamt für Kartographie und Geodäsie, Frankfurt am Main

Insgesamt 45 Isolate stammten aus Einsendungen an das RKI, 62 Isolate aus Einsendungen an das NRZ. Sowohl die Einsendung von Isolat an das RKI, als auch an das NRZ findet auf freiwilliger Basis statt. Unterschiede in der Präsenz einzelner Bundesländer unter den Einsendungen sind daher nicht zwangsläufig ein Resultat unterschiedlich hoher Prävalenzen, sondern können auch im unterschiedlichen Einsendeverhalten begründet sein. So stammten beispielsweise relativ viele ausgewählte Isolate aus dem Berliner Raum. Dies spiegelte den hohen Anteil von Isolat an dieser Region unter den Einsendungen an das RKI wider.

3.3.2 MLST-Typisierung

Die 107 sequenzierten Isolate verteilten sich auf insgesamt 21 verschiedene Sequenztypen. Die Verteilung der Sequenztypen auf die vier Carbapenemasen ist in Abbildung 12 dargestellt.

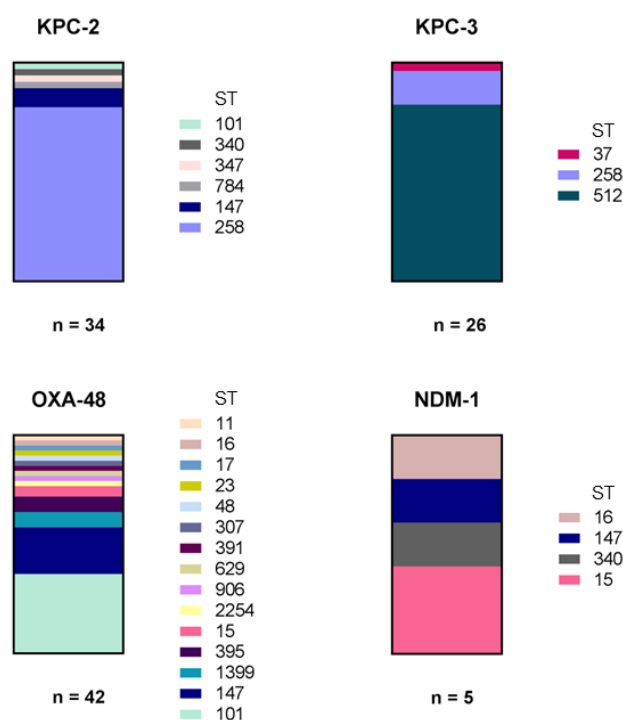


Abbildung 12 Verteilung der Sequenztypen in Abhängigkeit der produzierten Carbapenemase

Dargestellt ist der relative Anteil der jeweiligen Sequenztypen innerhalb der Gruppe der KPC-2-, KPC-3, OXA-48- und NDM-1-produzierenden Isolate.

Der Großteil der KPC-2-produzierenden Isolate entfiel auf den Sequenztyp ST258 (n = 27, 80 %). Drei Isolate gehörten zum Sequenztyp ST147 und jeweils ein Isolat konnte den Sequenztypen ST101, ST340, ST347 und ST784 zugeordnet werden. Die KPC-3-produzierenden Isolate zeigten bezogen auf die Sequenztypen die geringste Diversität. Der Sequenztyp ST512 war mit 21 Isolat (81 %) der am häufigsten vertretene Sequenztyp. Auf den Sequenztyp ST258 entfielen vier Isolate und der Sequenztyp ST37 wurde von einem Isolat vertreten. Die 42 OXA-48-produzierenden Isolate verteilten sich auf 15 verschiedene Sequenztypen. Den größten Anteil hatte mit 15 Isolat der Sequenztyp ST101 (36 %), gefolgt von ST147 mit neun Isolat (21 %). Die Sequenztypen ST1399 und ST395

waren mit jeweils drei Isolaten vertreten. Zwei Isolate gehörten zum Sequenztyp ST15 und jeweils ein Isolat wurde den Sequenztypen ST11, ST16, ST17, ST23, ST48, ST307, ST391, ST629, ST906 und ST2254 zugeordnet. Der Sequenztyp ST2254 wurde im Rahmen dieser Analyse erstmals identifiziert. Es handelte sich um eine neue Kombination schon bekannter Allele (*gapA_25*, *infB_33*, *mdh_141*, *pgi_26*, *phoE_7*, *rpoB_1*, *tonB_56*). Die Gruppe der fünf NDM-1-produzierenden Isolate entfiel auf vier Sequenztypen. Zwei Isolate gehörten zu ST15 und je ein Isolat konnte den Sequenztypen ST16, ST147 und ST340 zugeordnet werden.

3.3.3 Gehalt an Beta-Laktamase-Genen

Neben dem jeweiligen Carbapenemase-Gen konnten in den sequenzierten *Klebsiella*-Isolaten weitere Beta-Laktamase-Gene nachgewiesen werden. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Häufigkeit der einzelnen Beta-Laktamase-Gene. Fünf Varianten der chromosomal vorliegenden Beta-Laktamase SHV konnten identifiziert werden. Dabei war SHV-11 mit 68 % die mit Abstand am häufigsten vertretene Variante. In einem OXA-48-produzierenden und in einem KPC-2-produzierenden Isolat konnte kein *bla*_{SHV}-Gen detektiert werden. Es zeigte sich aber jeweils ein *bla*_{LEN}-Gen. Dies war ein erster Hinweis auf die Zugehörigkeit dieser Isolate zur Spezies *K. variicola*. Für ein KPC-3-produzierendes Isolat des Sequenztyps ST512 zeigte sich weder in den Ganzgenom-Daten, noch in der daraufhin durchgeführten PCR ein *bla*_{SHV}-Gen.

Tabelle 7 Nachgewiesene Beta-Laktamase-Gene in den Carbapenemase-produzierenden Isolaten

Angegeben sind jeweils die Anzahl und in Klammern der prozentuale Anteil der Isolate, in denen das entsprechende Gen nachgewiesen werden konnte. Die Auswertung erfolgte über ResFinder und wurde manuell ergänzt.

	Produzierte Carbapenemase				
	KPC-2 n = 34	KPC-3 n = 26	OXA-48 n = 42	NDM-1 n = 5	Gesamt n = 107
Chromosomale Beta-Laktamasen					
<i>bla</i> _{SHV-1}	2 (6 %)	-	16 (38 %)	1 (20 %)	19 (18 %)
<i>bla</i> _{SHV-11}	25 (74 %)	25 (96 %)	21 (50 %)	2 (40 %)	73 (68 %)
<i>bla</i> _{SHV-12}	6 (18 %)	-	-	-	6 (6 %)
<i>bla</i> _{SHV-28}	-	-	3 (7 %)	2 (40 %)	5 (5 %)
<i>bla</i> _{SHV-77}	-	-	1 (2 %)	-	1 (1 %)
<i>bla</i> _{LEN-16}	-	-	1 (2 %)	-	1 (1 %)
<i>bla</i> _{LEN-27}	1 (3 %)	-	-	-	1 (1 %)
Erworbene Beta-Laktamasen					
<i>bla</i> _{TEM-1}	25 (74 %)	23 (88 %)	34 (81 %)	3 (60 %)	85 (80 %)
<i>bla</i> _{OXA-1}	-	1 (4 %)	27 (64 %)	2 (40 %)	30 (28 %)
<i>bla</i> _{OXA-9}	1 (3 %)	-	10 (24 %)	1 (20 %)	12 (11 %)
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	-	-	4 (10 %)	-	4 (4 %)
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	1 (3 %)	1 (4 %)	15 (36 %)	5 (100 %)	22 (21 %)
<i>bla</i> _{CMY-2}	-	-	1 (2 %)	-	1 (1 %)
<i>bla</i> _{VER-1}	1 (3 %)	-	-	-	1 (1 %)

Die Mehrheit aller Isolate (80 %) wies das Beta-Laktamase-Gen *bla*_{TEM-1} auf. Deutlich seltener traten die Gene *bla*_{OXA-1} und *bla*_{OXA-9} auf (28 % bzw. 11 %). Insgesamt 24 % der Isolate trugen entweder *bla*_{CTX-M-15} oder *bla*_{CTX-M-14}, wobei *bla*_{CTX-M-15} deutlich häufiger auftrat und die OXA-48- und NDM-1-produzierenden Isolate eine höhere Prävalenz zeigten als die KPC-2- und KPC-3-produzierenden Isolate. Am seltensten nachgewiesen wurden die beiden Beta-Laktamase-Gene *bla*_{CMY-2} und *bla*_{VEB-1}. Sie traten jeweils nur bei einem einzigen Isolat auf.

3.3.4 Besitz von Virulenzgenen

Alle sequenzierten Isolate wurden auf das Vorkommen der folgenden Virulenzgene bzw. Virulenzgen-Cluster untersucht: *mrk*, Yersiniabactin, Allantoinase, Colibactin, Salmochelin, Aerobactin, *kfu*, Microcin, *rmpA*, *rmpA2* und *kvg*. Bis auf eine Ausnahme besaß keines der Isolate mehr als drei der genannten Gencluster. Die relativen Häufigkeiten der vier vorherrschenden Virulenzgen-Cluster in der hier untersuchten Population sind in Abbildung 13 dargestellt. Am häufigsten trat das *mrk*-Gencluster auf. So konnten die Gene *mrkA*, *mrkB*, *mrkC*, *mrkD*, *mrkF*, *mrkH*, *mrkI* und *mrkJ* in allen Isolaten nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich für 29 Isolate, dass das *mrkH*-Gen durch Insertion eines IS-Elements unterbrochen wurde. Eines dieser Isolate zeigte zudem die Insertion eines IS-Elements im *mrkI*-Gen. Ein weiteres Isolat wies eine Insertion im *mrkJ*-Gen auf. Ein vollständiges *mrk*-Gencluster besaßen folglich insgesamt 77 Isolate (72 %). Interessanterweise war die Insertionsstelle im *mrkH*-Gen bei 26 der 29 betroffenen Isolate komplett identisch. Nach 207 Nukleotiden wurde der Leserahmen des *mrkH*-Gens durch ein IS-Element (93% Übereinstimmung mit *ISEc21* laut ISfinder) unterbrochen. Bei diesen Isolaten handelte es sich um die 26 Isolate des Sequenztyps ST258 (*wzi*₂₉). Mit einem Vorkommen in 40 Isolaten war Yersiniabactin der zweithäufigste beobachtete Virulenzfaktor. Allerdings zeigten zwei Isolate in jeweils einem Gen (*ybtA* bzw. *irp2*) ein vorzeitiges Stoppcodon. Insgesamt 36 % aller Isolate wiesen demnach ein intaktes Cluster auf. Das *kfu*-Gencluster fand sich in 21 % der Isolate (n = 22). Darunter befanden sich alle Isolate der Sequenztypen ST101 (n = 16) und ST15 (n = 4) sowie eines der *K. variicola*-Isolate (328/15). Die Gene für das Siderophor-System Aerobactin konnten in insgesamt sechs Isolaten nachgewiesen werden.

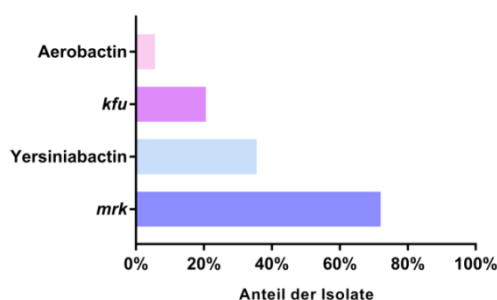


Abbildung 13 Virulenzgene in den Carbapenemase-produzierenden Isolaten

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der 107 sequenzierten Isolate, in denen das jeweilige Gencluster nachgewiesen werden konnte. Gezeigt sind die Daten für die vier Virulenzgen-Cluster, die in mehr als einem Isolat vorkamen.

Das zum Sequenztyp ST23 gehörende Isolat 316/15 fiel durch sein großes Repertoire an Virulenzfaktoren auf. So konnten bis auf *kvg* alle untersuchten Virulenzgen-Cluster aus den Ganzgenom-Daten rekonstruiert werden. Eine Übersicht über die nachgewiesenen Gene sowie die vorliegenden Allele gibt Tabelle 8. Bis auf das *rmpA2*-Gen zeigten alle Gene einen intakten Leserahmen. Der Leserahmen des *rmpA2*-Gens wurde durch ein vorzeitiges Stoppcodon unterbrochen.

Tabelle 8 Im ST23-Isolat (316/15) identifizierte Virulenzgene

Angegeben sind alle in den Ganzgenom-Daten nachweisbaren Virulenzgene sowie das jeweils identifizierte Allel. Die Auswertung erfolgte anhand der Virulenzgen-Datenbank des Pasteur-Instituts.

Virulenzfaktor	Locus_Allel
mrk	<i>mrkA_1, mrkB_1, mrkC_1, mrkD_1, mrkF_1, mrkH_1, mrkI_2, mrkJ_1</i>
Yersiniabactin	<i>ybtA_2, ybtE_2, ybtP_2, ybtQ_2, ybtS_2, ybtT_neu, ybtU_2, ybtX_2, irp1_6, irp2_36, fyuA_2</i>
Allantoinase	<i>allA_1, allB_1, allC_2, allD_1, allR_1, allS_1, ylbE_1, ylbF_1, gcl_2, fdrA_1, arcC_1, ybbW_1, ybbY_1, hyi_1, glxK_1, glxR_1</i>
Colibactin	<i>clbA_2, clbB_2, clbC_2, clbD_2, clbE_2, clbF_2, clbG_2, clbH_3, clbI_2, clbJ_neu, clbK_5, clbL_2, clbM_2, clbN_2, clbO_2, clbP_2, clbQ_2, clbR_2</i>
Salmocheilin	<i>iroB_1, iroC_4, iroD_1, iroN_1</i>
Aerobactin	<i>iutA_1, iucA_neu, iucB_1, iucC_1, iucD_1</i>
kfu	<i>kfuA_1, kfuB_1, kfuC_1</i>
Microcin	<i>mceA_1, mceB_1, mceC_1, mceD_2, mceE_1, mceG_2, mceH_1, mceI_2, mceJ_2</i>
rmpA	<i>rmpA_2</i>
rmpA2	<i>rmpA2_8 (Frameshift)</i>

Aufgrund des hohen Gehalts an Virulenzgenen wurde für das Isolat 316/15 der sogenannte *String-Test* durchgeführt. Dieser Test dient dem Nachweis eines hypermukoviskösen Phänotyps (Shon et al., 2013). Als positives Testergebnis gilt ein mehr als 5 Millimeter langer Schleimfaden, der sich beim Aufnehmen von Kolonien mit einer Impflohe von der Agarplatte bildet (Shon et al., 2013). Dies war für das Isolat 316/15 jedoch nicht der Fall.

3.3.5 *wzi*-Gen-Typisierung

Die Ganzgenom-Daten wurden genutzt, um die sequenzierten Isolate hinsichtlich ihres *wzi*-Allels zu typisieren und daraus den Kapseltyp abzuleiten. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die identifizierten *wzi*-Allele. Insgesamt wurden 25 verschiedene *wzi*-Allele identifiziert. Darunter befanden sich fünf erstmals identifizierte Allele (*wzi_508*, *wzi_552*, *wzi_553*, *wzi_554*, und *wzi_555*). Für ein Isolat war es nicht möglich das *wzi*-Gen zu typisieren. Das Gen konnte weder aus den Sequenzdaten rekonstruiert werden, noch per PCR amplifiziert werden.

Tabelle 9 Identifizierte *wzi*-Allele

Angegeben sind die in den Isolaten des jeweiligen Sequenztyps identifizierten *wzi*-Allele, sowie, im Falle verschiedener Allele, ihre Häufigkeit. Soweit bekannt, wurde der assoziierte Kapseltyp angegeben (Brisse et al., 2013). Mehrere Kapseltypen durch Komma getrennt geben an, dass das entsprechende Allel in Isolaten gefunden wurde, die mit unterschiedlichen Antisera reagierten. Zwei Kapseltypen verbunden durch ein Pluszeichen geben an, dass das Allel in Isolaten gefunden wurde, die mit beiden Antisera reagierten.

Sequenztyp	Anzahl	<i>wzi</i> -Allel	Assoziierter Kapseltyp (Brisse et al., 2013)
ST11	n = 1	<i>wzi</i> _177	
ST15	n = 4	<i>wzi</i> _24 (n = 2)	K24
		<i>wzi</i> _19 (n = 1)	K19
		<i>wzi</i> _552 (n = 1)	
ST16	n = 2	<i>wzi</i> _50	K15, K17, K50, K51, K52
ST17	n = 1	<i>wzi</i> _555	
ST23	n = 1	<i>wzi</i> _1	K1
ST37	n = 1	<i>wzi</i> _96	K38
ST48	n = 1	<i>wzi</i> _167	
ST101	n = 16	<i>wzi</i> _137	K17
ST147	n = 13	<i>wzi</i> _64 (n = 11)	K64 + K14
		<i>wzi</i> _12 (n = 1)	K12, K29
		unbekannt (n = 1)	
ST258	n = 31	<i>wzi</i> _29 (n = 26)	K41
		<i>wzi</i> _154 (n = 4)	
		<i>wzi</i> _83 (n = 1)	K23
ST307	n = 1	<i>wzi</i> _173	
ST340	n = 2	<i>wzi</i> _50	K15, K17, K50, K51, K52
ST347	n = 1	<i>wzi</i> _553	
ST391	n = 1	<i>wzi</i> _554	
ST395	n = 3	<i>wzi</i> _2	K2
ST512	n = 21	<i>wzi</i> _154	
ST629	n = 1	<i>wzi</i> _100	K10
ST784	n = 1	<i>wzi</i> _118	
ST906	n = 1	<i>wzi</i> _508	
ST1399	n = 3	<i>wzi</i> _43	K43
ST2254	n = 1	<i>wzi</i> _85	K30

Isolate desselben Sequenztyps besaßen nicht immer auch dasselbe *wzi*-Allel. So zeigten sich für die Isolate des Sequenztyps ST15 drei verschiedene *wzi*-Allele (*wzi*_24, *wzi*_19 und *wzi*_552). Auch in den Isolaten des Sequenztyps ST147 kamen drei verschiedene Allele vor, wobei der Großteil der Isolate mit *wzi*_64 assoziiert war. Die Mehrheit der Isolate des Sequenztyps ST258 trug das Allel *wzi*_29, welches dem *cpsI*-Cluster zugeordnet wird. All diese Isolate produzierten die Carbapenemase KPC-2. Hingegen trugen alle KPC-3-produzierenden Isolate des Sequenztyps ST258 das Allel *wzi*_154 (assoziiert mit dem *cps2*-Cluster). Nur ein ST258-Isolat trug ein anderes *wzi*-Allel (*wzi*_83).

Alle ST512-Isolate (ebenfalls Teil der klonalen Gruppe CG258) trugen das *wzi*-Allel 154. Das ST23-Isolat, das bereits durch seinen hohen Gehalt an Virulenzgenen aufgefallen war (siehe 3.3.4), wies das mit dem Kapseltyp K1 assoziierte Allel *wzi*_1 auf.

3.3.6 Plasmidgehalt – Nachweis von Inc-Gruppen

Der Plasmidgehalt der Carbapenemase-produzierenden Isolate bzw. die Inc-Gruppe der enthaltenen Plasmide wurde *in silico* über das Tool PlasmidFinder bestimmt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 14 dargestellt. Eine Übersicht über die in den einzelnen Isolat nachgewiesenen Replikons findet sich im Anhang (Tabelle A 2). Am häufigsten kamen die Inkompatibilitätsgruppen IncFII(K) und IncFIB(K) vor. Sie zeigten sich in 76 % bzw. 68 % aller Isolate und traten in Isolat aller Carbapenemasen auf. Bis auf eine Ausnahme fand sich in allen KPC-2-, in allen KPC-3- und in allen NDM-1-produzierenden Isolat mindestens ein Plasmidreplikon des Typs IncFIB und eines des Typs IncFII. In 73 % der KPC-2- und KPC-3-positiven Isolat konnte außerdem ein IncX3-Replikon nachgewiesen werden. Alle OXA-48-produzierenden Isolat zeigten das Vorhandensein eines IncM/L-Replikons (IncL/M(pMU407) oder IncL/M(pOXA-48)). Die Mehrheit der OXA-48-produzierenden Isolat wies zudem ein IncR-Replikon auf (62 %). In nur sehr wenigen Isolat wurde der Replikontyp IncN/IncN2 nachgewiesen (3 Isolat). Ein Replikon des Typs IncU wurde in nur einem Isolat identifiziert (ST347, KPC-2).

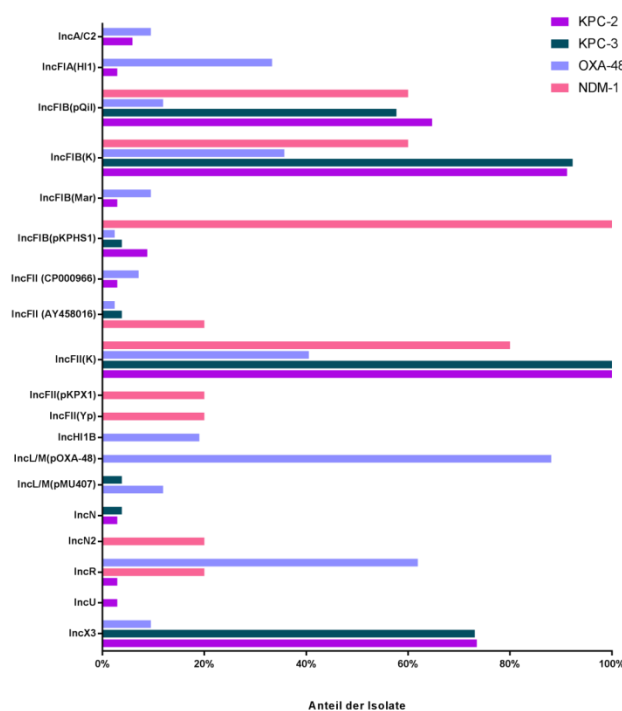


Abbildung 14 Über PlasmidFinder identifizierte Plasmid-Replikons in den Carbapenemase-produzierenden Isolat

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der 107 Isolat (aufgeteilt nach produzierter Carbapenemase), in denen das jeweilige Replikon identifiziert wurde.

3.3.7 Identifizierung der *K. variicola*-Isolate

Die Analyse des Resistenzgen-Gehalts lieferte einen ersten Hinweis auf die Zugehörigkeit von zwei der 107 sequenzierten *Klebsiella*-Isolate zur Spezies *K. variicola*. In den betroffenen Isolaten konnte das Beta-Laktamase-Gen *bla*_{LEN} (275/15 und 328/15, siehe 3.3.3) und nicht wie die anderen untersuchten Isolate ein *bla*_{SHV}-Gen nachgewiesen werden. Die daraufhin veranlasste Untersuchung der *gyrA*-Gen-Sequenz (*in silico*-Verdau mit TaqI und HaeIII) bestätigte die Zuordnung der beiden Isolate zur Phylogruppe KpIII bzw. zur Spezies *K. variicola*.

3.3.8 Phylogenie der Carbapenemase-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolate

Zur Darstellung der Verwandtschaft der sequenzierten Isolate wurde ein SNP-basierter *Maximum-Likelihood*-Baum erstellt. Als am besten geeignetes Referenzgenom wurde über RefRank das Genom des *K. pneumoniae*-Isolats *KPNIH30* (NCBI-Zugangsnummer NZ_CP009872.1) identifiziert. Die beiden als *K. variicola* identifizierten Isolate (siehe 3.3.7) wurden nicht in den Baum miteingeschlossen. Jedoch wurde eines der *K. variicola*-Isolate (ST906, OXA-48) als Außengruppe zum Wurzeln des Baums verwendet. Zwei der sequenzierten *K. pneumoniae*-Isolate (301/15 und 330/15) wurden aus der Baumberechnung ausgeschlossen, da sie nach dem *Mapping* auf das Referenzgenom mehr als 15 % mehrdeutige Platzhalter in der Consensus-Sequenz aufwiesen. Nach Ausschluss repetitiver Bereiche und mobiler genetischer Elemente ergaben sich 159 154 SNP-Positionen (Länge des Referenzgenoms: 5 306 618 bp). Der ausgehend von diesen SNPs berechnete Baum ist in Abbildung 15 dargestellt.

Die Population der Carbapenemase-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolate in Deutschland zeigte drei große Kladen, die von Isolaten der Sequenztypen ST258/ST512, ST147 und ST101 gebildet wurden. Für die Isolate der Sequenztypen ST258, ST512 und ST101 zeigte sich eine starke Assoziation von Sequenztyp und produzierter Carbapenemase. Die Isolate des Sequenztyps ST512 produzierten ausschließlich die Carbapenemase KPC-3. Der überwiegende Teil der ST258-Isolate produzierte KPC-2, ein kleinerer Teil produzierte KPC-3. Die Isolate des Sequenztyps ST101 produzierten bis auf eine Ausnahme die Carbapenemase OXA-48. In der Klade der ST147-Isolate fanden sich überwiegend Isolate, die die Carbapenemase OXA-48 produzierten, aber auch Isolate, die KPC-2 produzierten bzw. ein Isolat, das NDM-1 produzierte.

Neben den drei großen Kladen zeigten sich drei kleinere Kladen, die jeweils von Isolaten desselben Sequenztyps gebildet wurden. Die ST395-Klade wurde von drei OXA-48-produzierenden Isolaten gebildet. Ebenfalls drei OXA-48-produzierende Isolate gruppieren sich zur ST1399-Klade. Die dritte kleinere Klade bestand aus vier Isolaten des Sequenztyps ST15. Zwei der ST15-Isolate produzierten NDM-1 und zwei Isolate OXA-48.

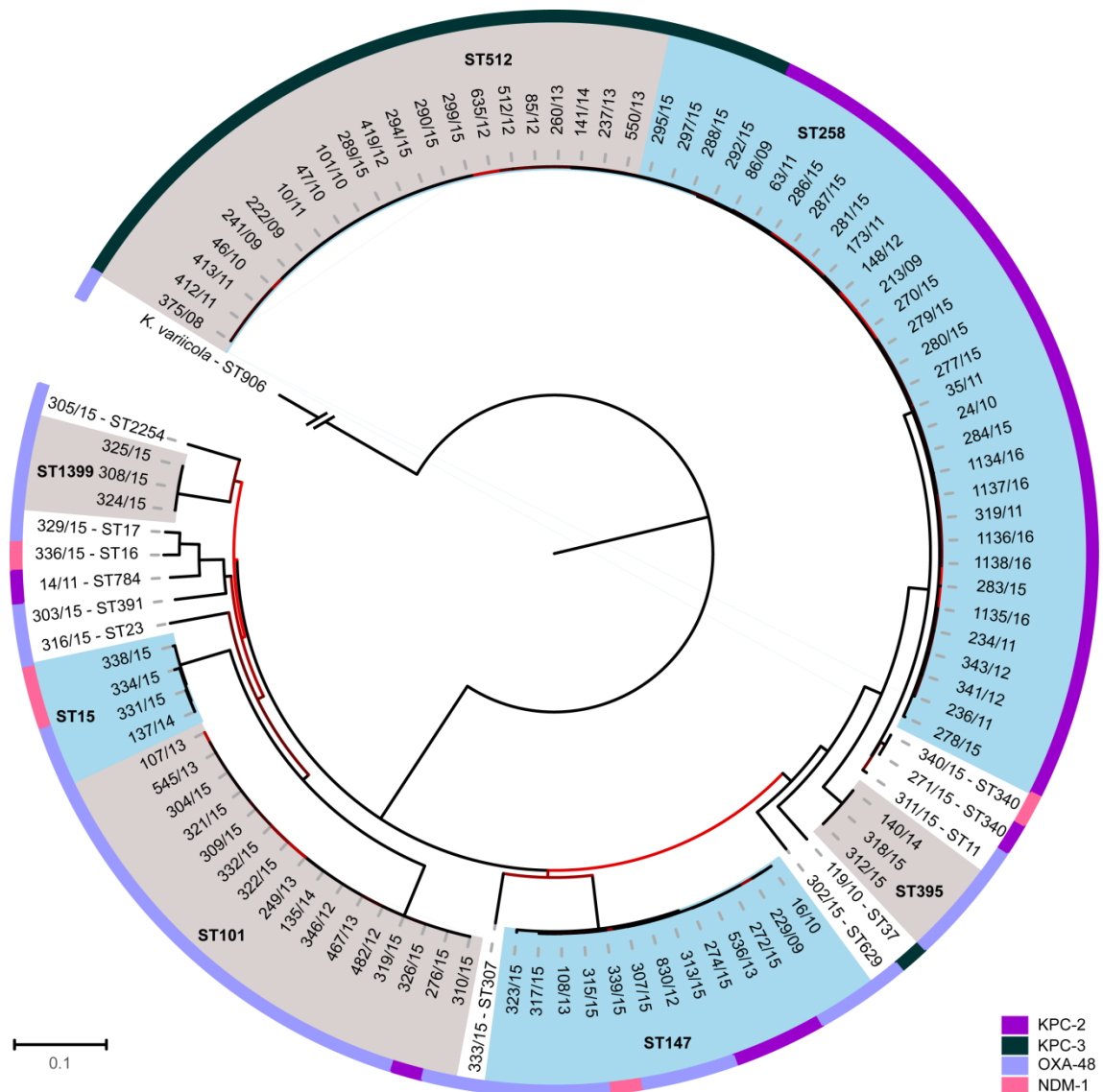


Abbildung 15 Phylogenie der Carbapenemase-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolate in Deutschland

Dargestellt ist der auf 159 154 SNP-Positionen basierende *Maximum-Likelihood*-Baum der 103 Carbapenemase-produzierenden Isolate aus Deutschland (2008 – 2014). Der Baum wurde über das *K. variicola*-Isolat (328/15) als Außengruppe gewurzelt (Verkürzung des Asts auf 1/100 zur besseren Darstellbarkeit). Für Klade mit drei oder mehr Isolat eines Sequenztyps (abwechselnd grau/blau hinterlegt) ist der MLST-Typ angegeben. Die produzierte Carbapenemase ist der Farbkodierung (Ring) zu entnehmen. Die Farbe der Äste korreliert mit den *Bootstrap*-Werten (Farbskala hellrot (0) bis schwarz (100)).

Die Isolate der ebenfalls zur klonalen Gruppe CG258 gehörenden Sequenztypen ST11 und ST340 bildeten eine gemeinsame Klade mit den Isolat der Sequenztypen ST258 und ST512. Eine detailliertere Ansicht der ST258- und ST512-Isolate gibt Abbildung 16. Bei Betrachtung der Isolate der Sequenztypen ST258 und ST512 zeigten sich zwei große Klade und ein separiert liegendes Isolat (278/15). Bei den beiden Klade handelte es sich um die zwei bekannten Klade innerhalb des

Sequenztyps ST258, die sich in ihrem *cps*-Cluster unterscheiden. Entsprechend besaßen die Isolate der ersten Klade das *wzi*-Allel 29 und die Isolate der zweiten Klade das *wzi*-Allel 154.

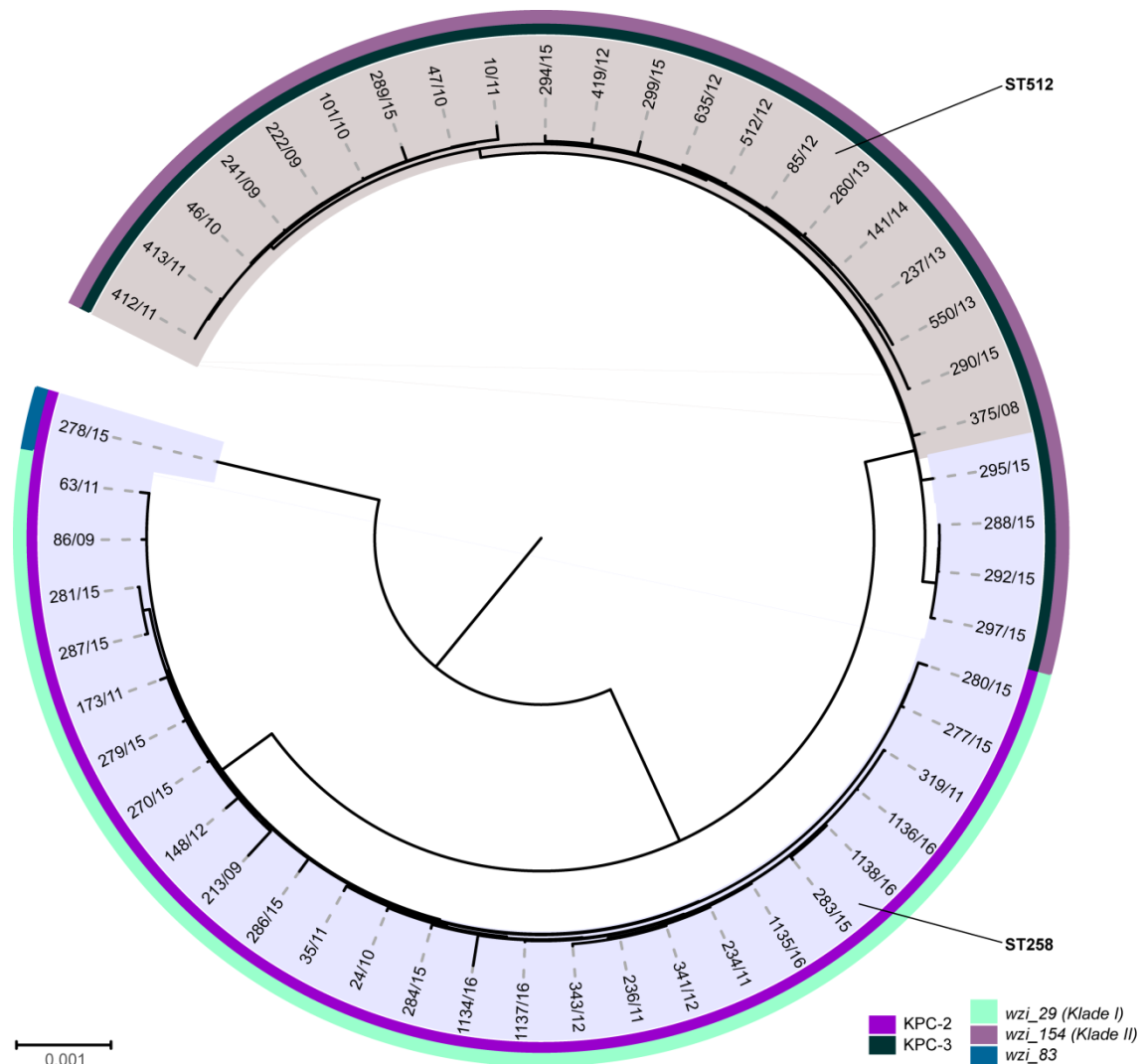


Abbildung 16 Detailansicht ST258 und ST512 – Carbapenemase-produzierende Isolate

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem in Abbildung 15 gezeigten Baum. Enthalten sind die 52 Isolate der Sequenztypen ST258 (blau hinterlegt) und ST512 (grau hinterlegt). Die Farbkodierung des inneren Rings gibt die produzierte Carbapenemase an, die Farbe des äußeren Rings entspricht dem *wzi*-Allel (siehe Legende).

Das separiert liegende Isolat wies das *wzi*-Allel 83 auf. Die Isolate des Sequenztyps ST512 bildeten wiederum eine eigene Klade innerhalb der Klade II. Das *wzi*_154-Allel zeigte sich in den hier sequenzierten Isolaten immer in Kombination mit der Produktion der Carbapenemase KPC-3, während das *wzi*_29-Allel ausschließlich in KPC-2-produzierenden Isolaten nachgewiesen wurde.

3.3.9 Einordnung der Carbapenemase-produzierenden Isolate in die internationale *K. pneumoniae*-Population

Um die Verwandtschaft der deutschen Carbapenemase-produzierenden Isolate mit internationalen Isolaten untersuchen zu können, wurde ein phylogenetischer Baum erstellt, der neben den selbst sequenzierten Isolaten *K. pneumoniae*-Isolate aus öffentlichen Datenbanken enthielt. Eingeschlossen in die Analyse wurden – unabhängig von der Produktion einer Carbapenemase – die Ganzgenom-Daten aller humanen *K. pneumoniae*-Isolate (KpI), die im Rahmen der 2015 publizierte Studie von Holt et al. sequenziert wurden (Illumina HiSeq), sowie die geschlossenen Genome aller humanen *K. pneumoniae*-Isolate, die im Dezember 2016 in der NCBI *Genome*-Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) verfügbar waren. Ausgehend von der Sequenz des Chromosoms wurden für die NCBI-Isolate artifizielle Miseq-*Reads* erzeugt, die anschließend wie die getrimmten Miseq- bzw. HiSeq-*Reads* der deutschen Carbapenemase-produzierenden bzw. der im Rahmen der Holt-Studie sequenzierten Isolate gegen das Referenzgenom *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* NTUH-K2044 (NCBI-Zugangsnummer NC_012731.1) aligniert wurden. Isolate mit einem Anteil von über 15 % mehrdeutigen Zeichen in der Consensus-Sequenz wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen, sodass insgesamt 337 *K. pneumoniae*-Isolate in die Baumberechnung einbezogen wurden (99 deutsche Carbapenemase-produzierende Isolate, 167 Isolate aus der Holt-Studie und 71 NCBI-Isolate). Nach Ausschluss repetitiver Bereiche und mobiler genetischer Elemente ergaben sich 126 347 SNP-Positionen (Länge des Referenzgenoms: 5 248 520 bp). Der daraus berechnete *Maximum-Likelihood*-Baum ist in Abbildung 17 dargestellt. Die Mehrheit der Isolate stammte aus Asien (139 Isolate). Insgesamt 59 Isolate wurden auf dem amerikanischen Kontinent isoliert und 33 Isolate stammten aus Australien. Zusätzlich zu den 99 Isolaten aus Deutschland befanden sich sieben europäische Isolate unter den analysierten Isolaten. Davon stammten drei aus Griechenland, je eins aus der Schweiz und aus Frankreich und zwei weitere aus Deutschland.

Insgesamt wurden 116 verschiedene Sequenztypen identifiziert, davon waren 36 Sequenztypen von mehr als einem Isolat vertreten. Die 238 internationalen Isolate verteilten sich dabei auf 108 verschiedene Sequenztypen, von denen 33 Sequenztypen mehr als einmal vorkamen (für 16 Isolate konnte der Sequenztyp nicht bestimmt werden). Damit zeigten die internationalen Isolate, bezogen auf die Sequenztypen, eine deutlich größere Diversität als die Carbapenemase-produzierenden Isolate aus Deutschland (21 verschiedene Sequenztypen bei 107 Isolaten). Die größten Cluster bildeten die Sequenztypen ST11, ST14, ST15, ST23, ST101, ST147, ST258 und ST512. Dabei wurde das ST14-Cluster ausschließlich von internationalen Isolaten gebildet, während das ST101-Cluster nur Carbapenemase-produzierende Isolate aus Deutschland enthielt.

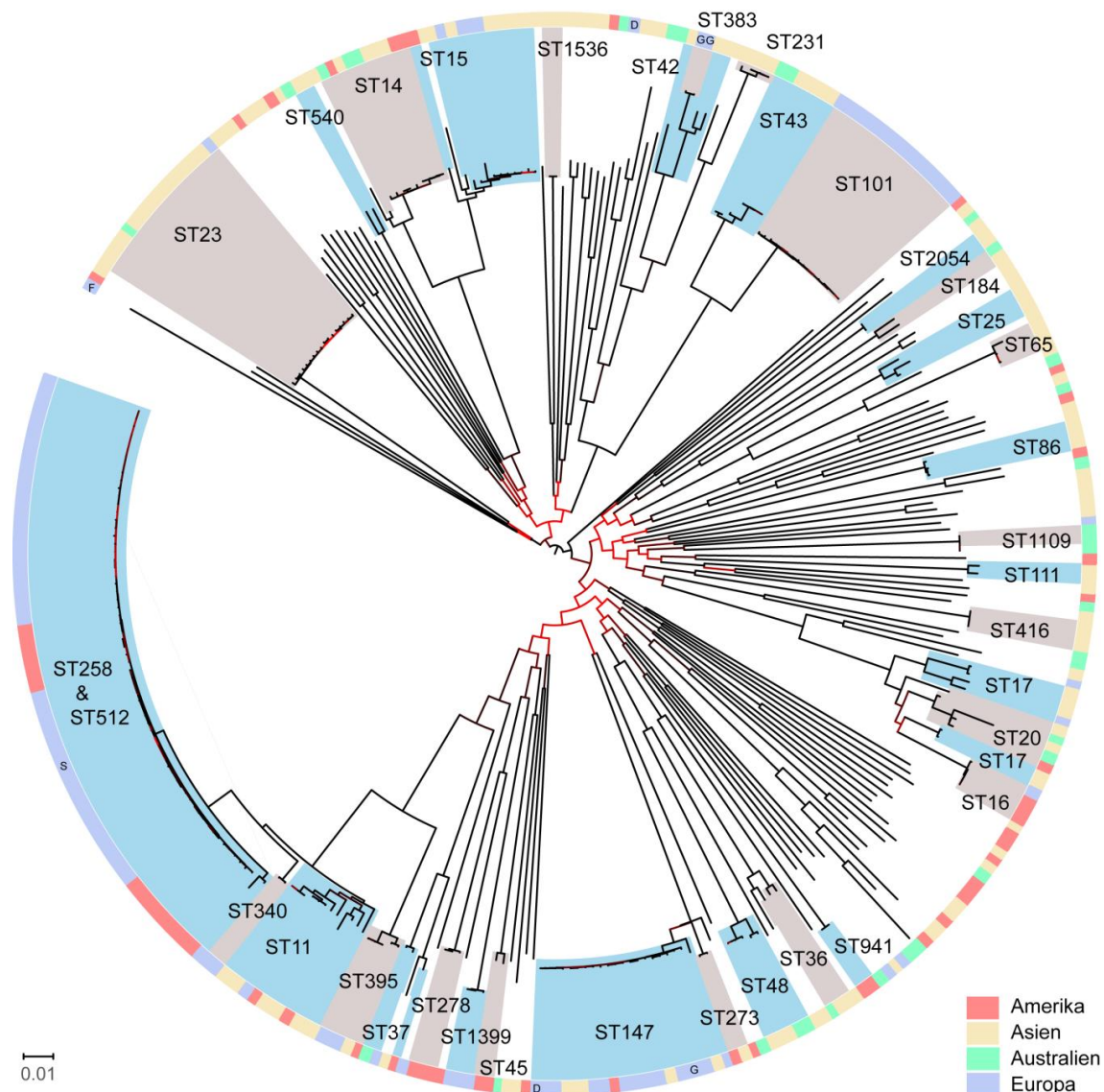


Abbildung 17 Phylogenie der Carbapenemase-produzierenden Isolate aus Deutschland und der internationalen *K. pneumoniae*-Isolate

Dargestellt ist der auf 126 347 SNP-Positionen basierende *Maximum-Likelihood*-Baum für 99 Carbapenemase-produzierende Isolate aus Deutschland und 238 internationale *K. pneumoniae*-Isolate. Der Baum wurde *midpoint* gewurzelt. Für Gruppen von zwei oder mehr Isolatentypen (abwechselnd grau/blau hinterlegt) ist der MLST-Typ angegeben. Die Herkunft der Isolate ist der Farbcodierung (Ring) zu entnehmen. Bei den europäischen Isolatentypen ohne weitere Markierung handelt es sich um die Carbapenemase-produzierenden Isolate aus Deutschland. Für die anderen sieben europäischen Isolate gibt der Buchstabe das Herkunftsland an (F, Frankreich; D, Deutschland; G, Griechenland; S, Schweiz). Die Farbe der Äste korreliert mit den *Bootstrap*-Werten (Farbskala hellrot (0) bis schwarz (100)).

Vertreter der innerhalb der Population der deutschen Carbapenemase-produzierenden Isolate beobachteten Klade der Sequenztypen ST15, ST147, ST258 und ST512 fanden sich also auch unter den internationalen Isolatentypen. Der Sequenztyp ST23 war der häufigste Sequenztyp innerhalb der Gruppe der asiatischen Isolate, trat aber in der Gruppe der deutschen Carbapenemase-produzierenden Isolate nur als Einzelisolat auf.

3.3.9.1 Vergleich der ST258/ST512-Isolate

Insgesamt entfielen 66 der 337 Isolate auf den Sequenztyp ST258 und seine *single locus*-Variante ST512. Der Großteil dieser Isolate stammte aus der Sammlung der deutschen Carbapenemase-produzierenden Isolate (n = 48). Die Genome der restlichen 18 Isolate waren bei NCBI hinterlegt. Von diesen Isolaten wurden 17 in Amerika isoliert und eines der Isolate stammte aus der Schweiz.

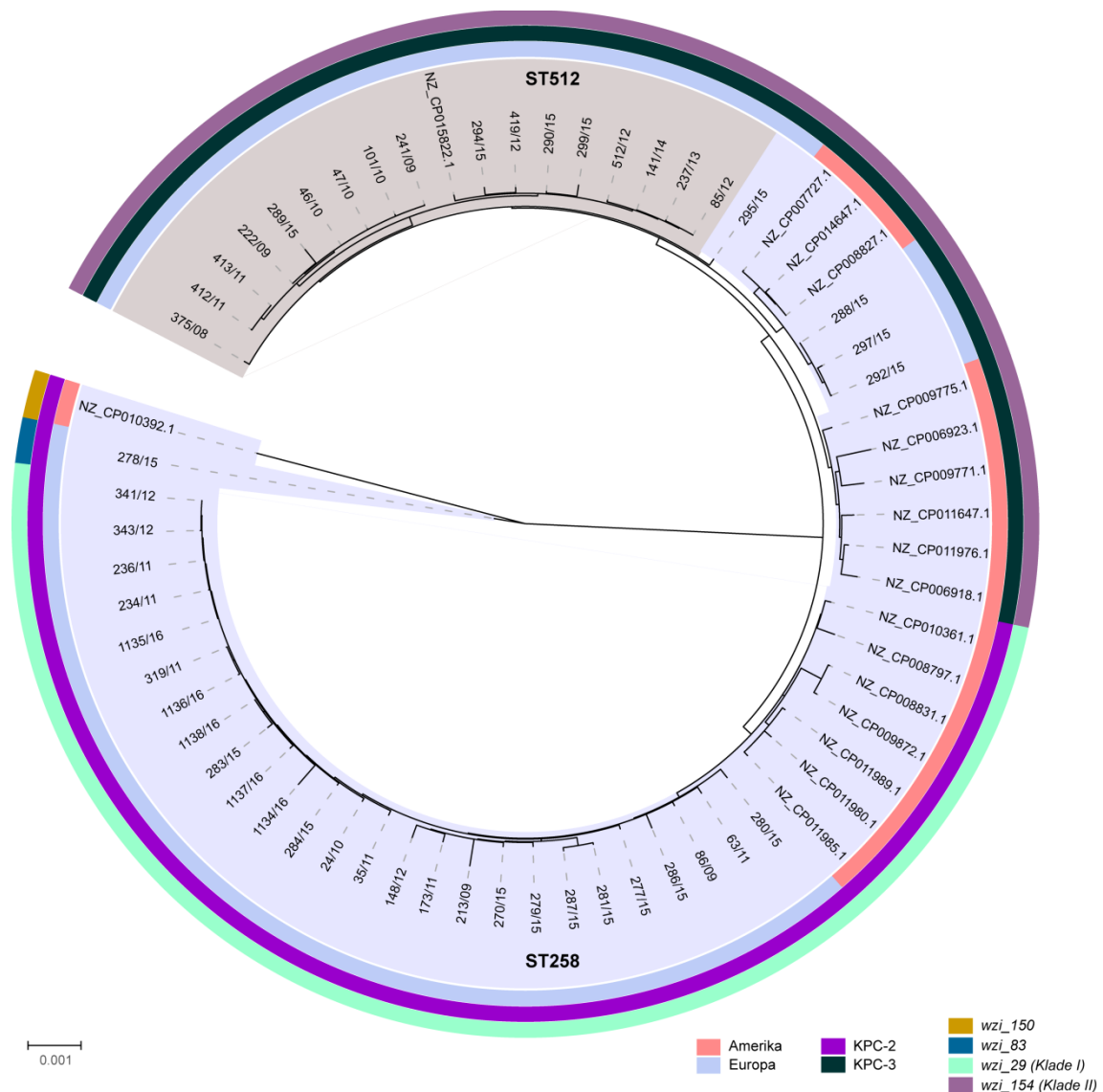


Abbildung 18 Detailansicht der Cluster ST258/ST512 – Internationale Isolate

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem in Abbildung 17 gezeigten Baum. Enthalten sind die 66 Isolate der Sequenztypen ST258 (blau hinterlegt) und ST512 (grau hinterlegt). Die Farbkodierung des inneren Rings gibt die Herkunft der Isolate an, die Farbe des mittleren Rings entspricht der produzierten Carbapenemase und die Farbe des äußeren Rings korreliert mit dem *wzi*-Allel.

Die Analyse der internationalen ST258- bzw. ST512-Isolate zeigte, dass alle in Besitz eines Carbapenemase-Gens waren (siehe Tabelle A 3 im Anhang). Alle amerikanischen Isolate gehörten zum Sequenztyp ST258, während das schweizer Isolat (NZ_CP015822.1) zum Sequenztyp ST512

gehörte. Eines der ST258-Isolate besaß das *wzi*-Allel 150. Die restlichen Isolate zeigten entweder das Allel *wzi*_154 oder *wzi*_29. Dabei zeigte sich dieselbe Assoziation von Carbapenemase und *wzi*-Allel, die auch schon für die deutschen Isolate beobachtet wurde: alle KPC-2-produzierenden Isolate trugen das Allel *wzi*_29, während alle KPC-3-produzierenden Isolate das Allel *wzi*_154 trugen. Die beiden Isolate mit den abweichenden *wzi*-Allelen lagen im Stammbaum separiert, während die anderen Isolate sich auf die Klade I und II verteilten (siehe Abbildung 18). Innerhalb der Klade I (ST258, *wzi*_29, KPC-2) ließen sich die amerikanischen und die deutschen Isolate aufgrund der Bildung von zwei separaten Untergruppen gut voneinander abgrenzen. Auch innerhalb der ST258-Isolate mit dem *wzi*-Allel 154 und der Carbapenemase KPC-3 zeigten die amerikanischen Isolate untereinander bzw. die deutschen Isolate untereinander eine nähere Verwandtschaft. Das schweizer ST512-Isolat (NZ_CP015822.1) wies eine nahe Verwandtschaft zu den deutschen ST512-Isolaten auf.

3.4 Analyse CTX-M-15-produzierender *Klebsiella*-Isolate aus einem Ausbruchsgeschehen

3.4.1 Hintergrund

Im Frühjahr 2015 wurde in einer Rehabilitationsklinik in Deutschland mit ca. 200 Betten ein gehäuftes Auftreten ESBL-produzierender *K. pneumoniae* verzeichnet. Als Reaktion auf die Häufung wurden die Hygienemaßnahmen intensiviert, das Hygienepersonal wurde aufgestockt, ein Hygieneteam wurde gebildet und es wurden vorrübergehende Aufnahmesperren angeordnet. Zudem wurden Patienten bei Nachweis von *K. pneumoniae* isoliert bzw. ab Oktober 2015 kohortiert. Das zuständige Gesundheitsamt wurde erstmals im Mai 2015 informiert. Ab Juni 2015 wurde ein wöchentliches Screening aller Patienten auf den betroffenen Stationen eingeführt (Trachealsekret/Urin), ab August 2015 wurde dieses Screening um Rektalabstriche und ein Screening bei Aufnahme neuer Patienten erweitert. Ebenfalls ab August wurde eine Typisierung von ESBL-positiven Isolaten über PFGE durch das NRZ für gramnegative Krankenhauserreger durchgeführt. Im September 2015 wurde das RKI eingeladen, die Untersuchung des Geschehens zu unterstützen. Die epidemiologische Bearbeitung wurde von Mitarbeitern des Fachgebiets 37 – Nosokomiale Infektionen, Surveillance von Antibiotikaresistenz und -verbrauch übernommen. Die molekularbiologische Aufarbeitung sowie die Ganzgenom-Sequenzierung der Isolate mittels der Miseq-Technologie war Teil der vorliegenden Arbeit und ist im Folgenden beschrieben. Zwischen April 2015 und Mai 2016 wurden bei 66 Patienten ESBL-positive *K. pneumoniae* nachgewiesen. Als nach Entlassung der letzten betroffenen Patienten keine neuen Fälle mehr auftraten, wurde der Ausbruch im Mai 2016 für beendet erklärt. Sequenziert wurden insgesamt 53 Isolate von 52 Patienten. Die Ganzgenom-Daten wurden zur Bearbeitung folgender Themen genutzt: (I) Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse der Isolate, (II) Etablierung einer für den Hauptausbruchstamm spezifischen PCR, (III) Charakterisierung der Isolate hinsichtlich Resistenz und Suche nach genetischen Determinanten für diese und (IV) Bewertung einer möglichen Verbindung zwischen den einzelnen Clustern.

3.4.2 Phylogenetische Analyse der Ausbruchs isolate

Um die Verwandtschaftsverhältnisse der sequenzierten Isolate darstellen zu können, wurde ausgehend von den Ganzgenom-Daten ein Stammbaum erstellt. Dazu wurden die Miseq-Reads aller Isolate gegen ein Referenzgenom aligniert und basierend auf den vorhandenen SNPs ein *Maximum-Likelihood*-Baum berechnet. Nach Ausschluss von repetitiven Bereichen und mobilen genetischen Elementen unterschieden sich die Isolate an 242 738 Positionen (Länge des Referenzgenoms: 5 317 001 bp). Da sich unter den sequenzierten Isolaten nicht nur *K. pneumoniae*-Isolate befanden, wurde zum Wurzeln des Baums über eine Außengruppe ein *K. oxytoca*-Genom verwendet. Durch Einfügen der Außengruppe ging ein Teil dieser SNP-Positionen verloren (72 672 SNPs, ca. 30 %). Insgesamt

erhöhte sich aber die Zahl der SNP-Positionen durch die Außengruppe auf 468 250. Die phylogenetische Analyse identifizierte drei Ausbruchcluster (Abbildung 19a).

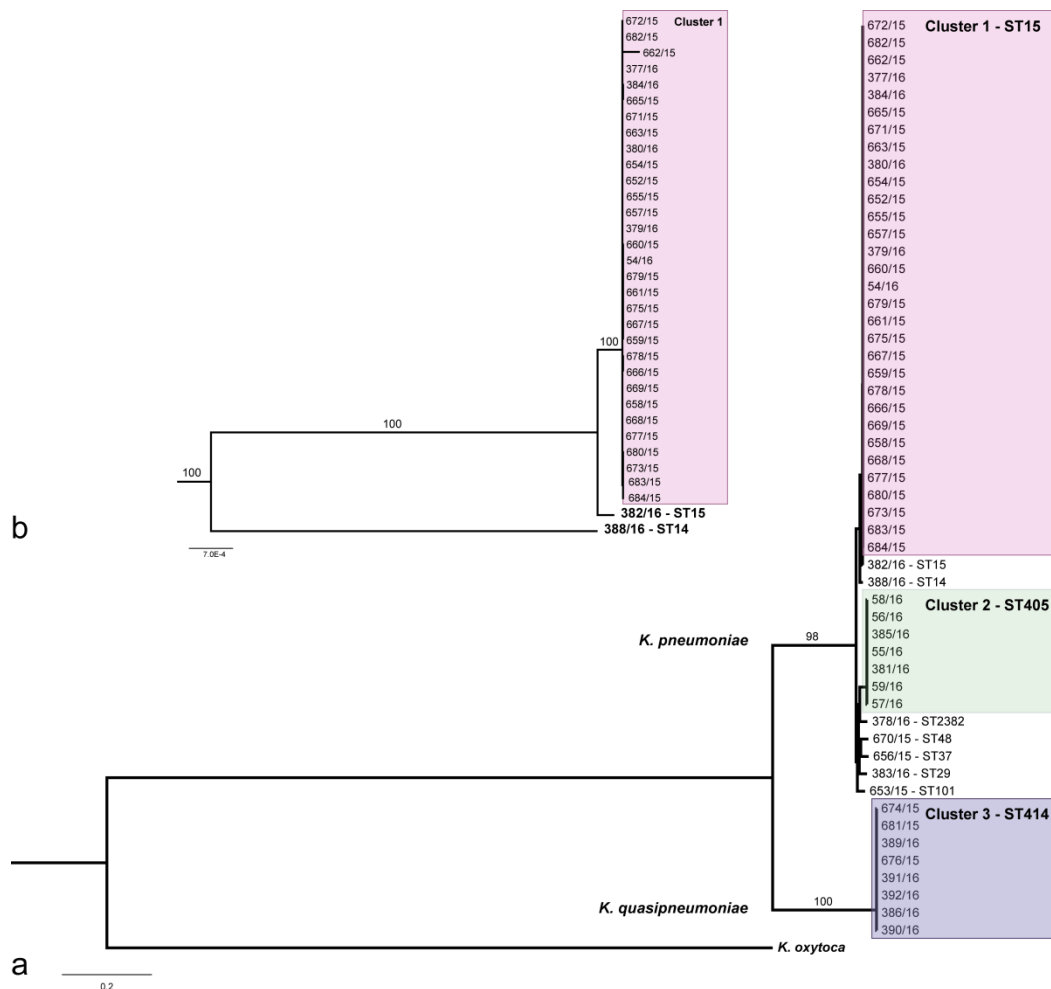


Abbildung 19 Phylogenie der im Rahmen der Ausbruchsanalyse sequenzierten *Klebsiella*-Isolate

(a) Der *Maximum-Likelihood*-Baum basiert auf 468 250 SNPs, die nach dem *Mapping* der *Miseq-Reads* auf das Referenzgenom (PMK-1) gefiltert wurden. Das *K. oxytoca*-Genom (KONIH1) diente als Außengruppe, um den Baum zu wurzeln. Die Werte auf den Ästen entsprechen den *Bootstrap*-Werten (100 Wiederholungen). Die drei Ausbruchcluster sind farblich hinterlegt. **(b)** Detailansicht des Cluster 1-Baums und der beiden ST14- und ST15-Einzelisolate.

Das größte Cluster wurde von 31 Isolat gebildet, die zum Sequenztyp ST15 gehörten. Zum zweiten Cluster gehörten sieben Isolate des Sequenztyps ST405. Das dritte Cluster bildeten acht Isolate des Sequenztyps ST414. Außerdem zeigten sich sieben Einzelisolate verschiedener Sequenztypen (ST14, ST15, ST29, ST37, ST48, ST101 und ST2382). Ein Teil der Isolate wurde vor der Sequenzierung über PFGE typisiert (durchgeführt vom NRZ). Die Ganzgenom-basierte Einteilung in drei Cluster und Einzelisolate stimmte für diese Isolate mit der PFGE-basierten Einteilung überein (PFGE-Typen 1, 2, 3; siehe Tabelle A 4 im Anhang). Der Sequenztyp ST2382 wurde im Rahmen dieser Analyse erstmals identifiziert; das Isolat 378/16 besaß ein neues *pgi*-Allel (*pgi*_158). Das Einzelisolat mit demselben

Sequenztyp wie das Hauptcluster (382/16) ließ sich im phylogenetischen Baum deutlich von dem Ausbruchcluster abgrenzen (*Bootstrap*-Wert 100, siehe Abbildung 19b). Die Analyse der *wzi*-Gensequenz zeigte, dass das Einzelisolat und die Cluster 1-Isolate unterschiedliche *wzi*-Allele besaßen. Das Einzelisolat trug das Allel *wzi*_24, während die Isolate des ST15-Clusters das Allel *wzi*_93 trugen. Die Sequenztypen ST15 und ST405 konnten der Phylogruppe KpI bzw. der Spezies *K. pneumoniae* zugeordnet werden. Hingegen wurden die Isolate des Sequenztyps ST414 aufgrund des Vorhandenseins der chromosomalen Beta-Laktamase OKP-B sowie der Sequenz des *gyrA*- und des *parC*-Gens der Phylogruppe KpII bzw. der Spezies *K. quasipneumoniae* zugeordnet. Die separierte Lage des ST414-Clusters im Stammbaum bestätigte diese Zuordnung.

3.4.3 Entwicklung einer Cluster 1-spezifischen PCR

Basierend auf den Ganzgenom-Daten war es möglich, Isolate dem Ausbruch zuzuordnen bzw. zu zeigen, dass sie nicht zum Ausbruch gehören. Allerdings nahm die Miseq-Sequenzierung inklusive Probenvorbereitung und Auswertung einige Tage in Anspruch. Um in kürzerer Zeit eine Aussage über die Zugehörigkeit zum Ausbruchcluster treffen zu können, wurde daher im Rahmen dieser Arbeit eine Cluster 1-spezifische PCR entwickelt. In die Entwicklung der PCR eingeschlossen wurden die 38 zuerst sequenzierten Isolate, von denen 27 zum Cluster 1 gehörten. Die Idee war, drei Bereiche in der PCR zu amplifizieren, die in ihrer Kombination spezifisch für das Ausbruchcluster waren. Das erste Primerpaar (hem-F/-R) sollte spezifisch für den Sequenztyp ST15 sein, das zweite Primerpaar (unique-F/-R) sollte spezifisch für den Ausbruchstamm sein und das dritte Primerpaar (4,160 kb-F/-R) sollte einen einzigartigen Bereich innerhalb eines Plasmids, das in den Ausbruchsisolaten identifiziert worden war, amplifizieren. Da Plasmide umstrukturiert werden oder verloren gehen können, wurden die Ergebnisse der PCR folgendermaßen interpretiert: (I) Alle drei Banden vorhanden – Isolat ist als Teil des Ausbruchs anzusehen, (II) Alle Banden bis auf die Bande des Primerpaars 4,160 kb-F/-R vorhanden – Isolat ist wahrscheinlich Teil des Ausbruchs, (III) Alle weiteren Möglichkeiten – Isolat ist kein Teil des Ausbruchs.

Die PCR wurde zunächst mit den Isolaten getestet, die Teil der Entwicklung waren. Wie in Abbildung 20a zu sehen, stimmte das Ergebnis der PCR in allen Fällen mit dem Ergebnis der Ganzgenom-Sequenzierung überein. Einem Cluster 1-Isolat fehlte die 4,160 kb-F/-R-Bande (#31). Die Analyse der Genomdaten ergab, dass es hier zu einer Umstrukturierung des Plasmids gekommen war. Im zweiten Schritt wurde die PCR genutzt, um neu eingetroffene, potenzielle Ausbruchsisolate zu charakterisieren. Auch hier zeigte sich eine Übereinstimmung der PCR-Ergebnisse mit den Ergebnissen der anschließenden Miseq-Sequenzierung (Abbildung 20b). Allerdings zeigte ein Isolat (#40 – 378/16), das dem neu beschriebenen Sequenztyp ST2382 angehörte, ebenfalls das PCR-Produkt des als ST15-spezifisch vermuteten Primerpaars hem-F/-R. Um im letzten Schritt die Spezifität der PCR zu prüfen, wurden 20 zufällig ausgewählte *K. pneumoniae*-Isolate aus

verschiedenen Krankenhäusern in Deutschland getestet. Das Ergebnis der PCR bestätigte für alle getesteten Isolate, dass sie nicht zum Ausbruch gehörten (Abbildung 20c). Drei der Isolate gehörten zum Sequenztyp ST15 (F, S, T; siehe Tabelle A 6 im Anhang). Diese Isolate zeigten eine Amplifikation des Produkt des hem-F/-R-Primerpaars, ließen sich aber durch die Abwesenheit der beiden anderen PCR-Produkte von den Ausbruchsisolaten abgrenzen.

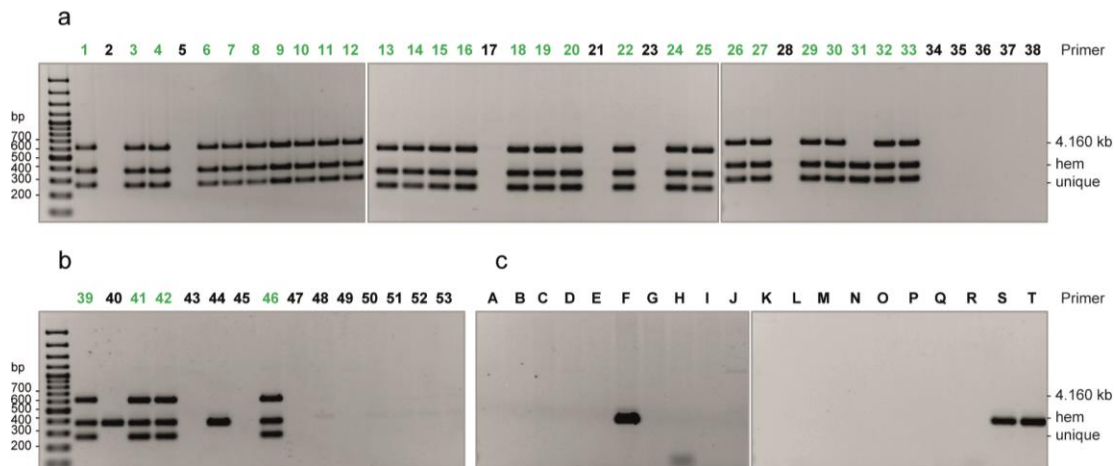


Abbildung 20 Gel-Elektrophorese der Produkte der Cluster 1-spezifischen Multiplex-PCR

Gezeigt sind die Produkte (3 µl) der Multiplex-PCR nach Auftrennung im Agarosegel (1,4 %). Isolate, die laut den Ganzgenom-Daten zum Cluster 1 gehörten, sind grün markiert. (a) Isolate aus der Rehabilitationsklinik, die verwendet wurden, um die PCR zu entwickeln. (b) Weitere Klinikisolate, die vor der Miseq-Sequenzierung über die PCR typisiert wurden. (c) Je 10 epidemiologisch nicht mit dem Ausbruchstamm verwandte ESBL-produzierende (A-J) und Carbapenemase-produzierende (K-T) *K. pneumoniae*-Isolate aus der Stammsammlung des RKI, die verwendet wurden, um die Spezifität der PCR zu testen. Größe der erwarteten PCR-Produkte: Primerpaar 1 (4,160 kb-F/-R) 606 bp, Primerpaar 2 (hem-F/-R) 379 bp, Primerpaar 3 (unique-F/-R) 265 bp.

3.4.4 Analyse des Resistenzprofils

Die Isolation der Bakterien aus Patientenmaterial wurde vom Routinelabor der Klinik durchgeführt. Im Rahmen der Primärdiagnostik erfolgte eine biochemische und MALDI-TOF-basierte Speziesidentifikation. ESBL-positive Isolate wurden unter Verwendung eines chromogenen Differentialagars (ChromID-ESBL) identifiziert und die Antibiotikaempfindlichkeit wurde über das Automaten-system BD Phoenix bestimmt. Isolate aller drei Cluster zeigten einen ESBL-Phänotyp (Robert Koch-Institut, 2016).

In der Ganzgenom-Analyse konnte das Beta-Laktamase-Gen *bla*_{CTX-M-15} in allen Isolaten der drei Cluster als das für den ESBL-Phänotyp verantwortliche Gen nachgewiesen werden. Die Mehrheit der Cluster 1-Isolate (26 von 31 Isolaten, 84 %) war zudem in Besitz der drei Beta-Laktamase-Gene *bla*_{SHV-28}, *bla*_{TEM-1} und *bla*_{OXA-534}. Bei *bla*_{OXA-534} handelt es sich um eine neue, im Rahmen der Ausbruchsanalyse erstmals identifizierte Allelvariante (NCBI-Zugangsnummer KX714285). Die Isolate des Clusters 1 waren resistent gegenüber Piperacillin, Cefotaxim, Ceftazidim, Cefepim,

Aztreonam, Tobramycin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Trimethoprim-Sulfamethoxazol. Hingegen zeigte sich bis auf zwei Ausnahmen keine Resistenz gegenüber den Carbapenemen Imipenem und Meropenem bzw. gegenüber Colistin. Die abweichenden Resistenzphänotypen dieser zwei Isolate wurden durch das Kliniklabor detektiert und bestätigten sich in unseren Analysen. Das Isolat 675/15 zeigte sich resistent gegenüber Colistin (Vitek 2 MHK >8 mg/l, Etest MHK 16-24 mg/l). Allerdings wurde der Patient zu keinem Zeitpunkt mit Colistin therapiert. Um die genetische Ursache für die Resistenz zu finden, wurden in den Ganzgenom-Daten die Gene, die mit bereits beschriebenen Resistenzmechanismen assoziiert sind, untersucht. Weder das plasmid-codierte *mcr-1*-Gen, noch eine der bisher beschriebenen *mcr*-Gen-Varianten war in dem Isolat vorhanden. Das *rrrB*-Gen konnte in keinem der Cluster 1-Isolate nachgewiesen werden. Auch gab es keine Unterschiede in den Genen *pmrA* und *pmrB* und in den Genen *phoP* und *phoQ* im Vergleich zu den anderen Isolaten des Clusters 1. Hingegen konnte im *mcrB*-Gen an Position 88 der DNA-Sequenz ein Nukleotidaustausch von Cytosin zu Tyrosin detektiert werden. Dieser Austausch resultierte in einem vorzeitigen Stoppcodon und damit in einem trunkeierten Protein (29 statt 47 Aminosäuren). Das Isolat 684/15 zeigte sich unempfindlich gegenüber Carbapenemen (Etest MHK Ertapenem >32 mg/l; MHK Meropenem 8 mg/l; MHK Imipenem 3 mg/l). Dieses Isolat stammte von einem Patienten, der, nachdem bei ihm eine Infektion mit einem Cluster 1-Isolat (680/15) festgestellt wurde, acht Tage lang mit Meropenem behandelt wurde (dreimal täglich 2 Gramm, intravenös). Das resistente Isolat wurde fünf Tage nach dem Ende der Behandlung, also 13 Tage nach der ersten Meropenemgabe, erstmals detektiert. Carbapenemase-Gene konnten in dem Isolat nicht nachgewiesen werden. Jedoch zeigten sich bei der Analyse der Poringene *ompK35* und *ompK36* Veränderungen im Vergleich zum ersten Isolat. So wurde der Leserahmen des *ompK35*-Gens durch Insertion eines Transposase-Gens (*ISEcp1*) unterbrochen. Im *ompK36*-Gen zeigte sich die Deletion eines Nukleotids (C194-). Dies führte zu einem vorzeitigen Stoppcodon an Aminosäureposition 71. Alle weiteren im Rahmen der Ausbruchsanalyse sequenzierten Isolate wurden ebenfalls auf Veränderungen in ihren Porin-Genen untersucht. Veränderungen in beiden Porin-Genen zeigte keines der Isolate. Drei Isolate wiesen jedoch Veränderungen in jeweils einem Porin-Gen auf (siehe Tabelle A 4 im Anhang). Der Resistenzphänotyp zeigte sich allerdings wenig bis gar nicht beeinflusst (siehe Tabelle A 4 und Tabelle A 5 im Anhang).

3.4.5 Untersuchung des Plasmidgehalts

Bei Auftrennung der extrahierten DNA im Agarosegel zeigten sich für alle bis auf drei Cluster 1-Isolate drei Plasmide mit Größen von unter 20 kb. Die Sequenzen der Plasmide konnte durch *de novo-Assembly* aus den Miseq-Daten des Isolats 652/15 rekonstruiert werden. Die rekonstruierten Plasmide hatten eine Größe von 3,223 kb, 3,559 kb und 4,160 kb. Der Vergleich der rekonstruierten Plasmid-Sequenzen mit bei NCBI hinterlegten Sequenzen über BLAST (*nucleotide collection*) zeigte, dass

zwei der Plasmide nahezu identisch mit bereits publizierten Plasmidsequenzen waren. So stimmte das 3,223 kb-Plasmid in 3 222 von 3 223 Basenpaaren mit dem *Citrobacter freundii*-Plasmid pCAV1321-3223 (NCBI-Zugangsnummer CP011604) überein. Dieses Plasmid codiert für das *Multidrug*-Transporter-Protein EmrE. Plasmide derselben Größe und mit einem maximalen Unterschied von drei Nukleotiden wurden bereits in anderen Genera identifiziert, z.B. *Serratia* (NCBI-Zugangsnummer CP011637), *Salmonella* (CP016867), *Enterobacter* (KU302804, CP011569, CP011658) und *Klebsiella* (CP003994, CP01299, CP014305). Das 3,559 kb-Plasmid stimmte in 3 558 Basenpaaren mit dem *K. pneumoniae*-Plasmid pKp_Goe_917-7 (CP018446) überein. Das publizierte Plasmid stammt aus einem ST11-Isolat, das 2013 in einem deutschen Krankenhaus isoliert wurde. Die annotierten Gene codieren entweder für Proteine, die eine Rolle bei der Plasmidreplikation spielen oder für hypothetische Proteine, sodass sich über die Funktion des Plasmids keine Aussagen treffen lassen.

Um den Gehalt und die Größe von Plasmiden größer als 30 kb zu bestimmen, wurde exemplarisch für drei Cluster 1-Isolate ein S1-Nuklease-Verdau mit anschließender PFGE durchgeführt. Jedes der drei Isolate enthielt große Plasmide, allerdings unterschieden sich diese in Anzahl und Größe. So zeigte sich für das Isolat 652/15 ein Plasmid mit einer ungefähren Größe von 200 kb, das Isolat 662/15 besaß zwei Plasmide mit ungefähren Größen von 70 kb und 200 kb und das dritte Isolat (666/15) enthielt ein Plasmid mit einer ungefähren Größe von 230 kb. Damit fand sich kein Hinweis auf ein gemeinsames, in allen Cluster 1-Isolaten vorhandenes Plasmid.

Angeichts desselben ESBL-Gens in den Isolaten aller drei Cluster, stellte sich die Frage, ob eine Verbindung der Cluster über ein gemeinsames Plasmid bestand. Die Inc-Gruppen der enthaltenen Plasmide wurden daher über das Tool PlasmidFinder aus den Ganzgenom-Daten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Ein in allen Clustern vorhandener Replikontyp konnte nicht identifiziert werden. Alle bis auf zwei Isolate des Clusters 1 besaßen ein IncR-Replikon. Außerdem besaßen alle Cluster 1-Isolate IncFII und IncFIB(K). Insgesamt 26 der 31 Isolate (84 %) trugen zusätzlich ein IncFIA(HI1)-Replikon. In allen Cluster 2-Isolaten wurden die Replikontypen IncFIB(pKPHS1) und IncFIB(K) identifiziert. Zwei Isolate zeigten zusätzlich ein IncFII(K)-Replikon. Alle Cluster 3-Isolate wiesen ein IncFIB(K)-ähnliches Replikon auf (91,55 % Übereinstimmung mit der Referenz). Der Replikontyp IncFIB(K) war damit als einziger Typ in mehr als einem Cluster vertreten. Die Sequenz des zur Typisierung genutzten *repB*-Gens unterschied sich jedoch zwischen den beiden Clustern. Bezogen auf die gesamte Länge des *repB*-Gens unterschieden sich Cluster 1 und 2 in vier Nukleotiden. In nur einem Fall hatte das unterschiedliche Nukleotid eine Veränderung der Aminosäuresequenz zur Folge.

Tabelle 10 Über PlasmidFinder identifizierte Plasmidreplikons in den Ausbruchsisolaten

	Replikon (Referenz)	Übereinstimmung	Abdeckung [bp]	Vorkommen
Cluster 1 – ST15				
	IncR (DQ449578)	100 %	251/251	29/31
	IncFIB(K) (JN233704)	99,11 %	560/560	31/31
	IncFIA(HI1) (AF250878)	98,45 %	387/388	26/31
	IncFII (CP000966)	96,38 %	221/230	31/31
Cluster 2 – ST405				
	IncFII(K) (CP003223)	95,95 %	148/148	2/7
	IncFIB(K) (JN233704)	98,93 %	560/560	7/7
	IncFIB(pKPHS1) (CP000648)	95,54 %	560/560	7/7
Cluster 3 – ST414				
	IncFIB(K) (JN233704)	91,55 %	556/560	8/8

3.4.6 Analysen zur Lokalisation des *bla*_{CTX-M-15}-Gens

Das *bla*_{CTX-M-15}-Gen liegt meistens plasmid-codiert vor, es kann jedoch auch im Chromosom vorkommen. Auch das gleichzeitige Vorkommen in Plasmid und Chromosom wurde für *K. pneumoniae* beschrieben. Um die Frage nach der Lokalisation in den Ausbruchsisolaten zu beantworten, wurde die Umgebung des *bla*_{CTX-M-15}-Gens untersucht. Die durch *de novo*-Assembly erhaltenen *Contigs*, in denen sich das *bla*_{CTX-M-15}-Gen befand, zeigten für die Cluster 1-Isolate sehr unterschiedliche Größen. Die durchschnittliche Größe lag bei ca. 56 kb. Das kleinste *Contig* war ca. 3 kb lang, das größte 208 kb. Die *Contigs* der Cluster 2-Isolate waren ca. 5 kb lang, die *Contigs* der Cluster 3-Isolate etwa 6,5 kb. Die Analyse zeigte, dass die Isolate der Cluster 1 und 3 *upstream* des *bla*_{CTX-M-15}-Gens ein *ISEcp1*-Transposase-Gen (identisch zu AJ242809) aufwiesen (siehe Abbildung 21). Die Isolate des Clusters 2 hingegen zeigten *upstream* des *bla*_{CTX-M-15}-Gens ein *IS15DIV*-Transposase-Gen (identisch zu X13616). Da die *Contigs* nicht das gesamte *IS15DIV*-Transposase-Gen abdeckten, wurde eine PCR mit anschließender Sanger-Sequenzierung durchgeführt, die die Sequenz bestätigte. Die für die Cluster 2- und 3-Isolate erhaltenen *Contigs* waren zu klein, um sie eindeutig dem Chromosom oder einem Plasmid zuordnen zu können. In den rekonstruierten Bereichen konnten keine Gene identifiziert werden, die eine eindeutige Zuordnung erlaubten.

Für 11 Isolate des Clusters 1 lag das *bla*_{CTX-M-15}-Gen auf einem *Contig* mit dem chromosomal codierten *dnaA*-Gen. Hingegen zeigte ein Isolat, das zu Beginn des Ausbruchs isoliert wurde, eine

Lokalisation des *bla*_{CTX-M-15}-Gens auf einem *Contig*, das auch das plasmid-codierte *repB* (IncR1)-Gen enthielt. Für neun weitere Isolate stimmte die *upstream* des *bla*_{CTX-M-15}-Gens gelegene Sequenz mit dieser Sequenz überein. Allerdings lag das *repB*-Gen außerhalb der rekonstruierten Sequenz und die *downstream* des *bla*_{CTX-M-15}-Gens gelegenen Bereiche unterschieden sich zum Teil zwischen den Isolaten. Es zeigten sich damit sowohl Hinweise auf ein chromosomales, als auch auf eine plasmidales Vorkommen des *bla*_{CTX-M-15}-Gens innerhalb des Ausbruchs. Dabei unterschieden sich die *Contigs*, die für eine chromosomale bzw. plasmidale Lokalisation sprachen, im Bereich *upstream* der *ISEcp1*-Transposase (siehe Abbildung 21).

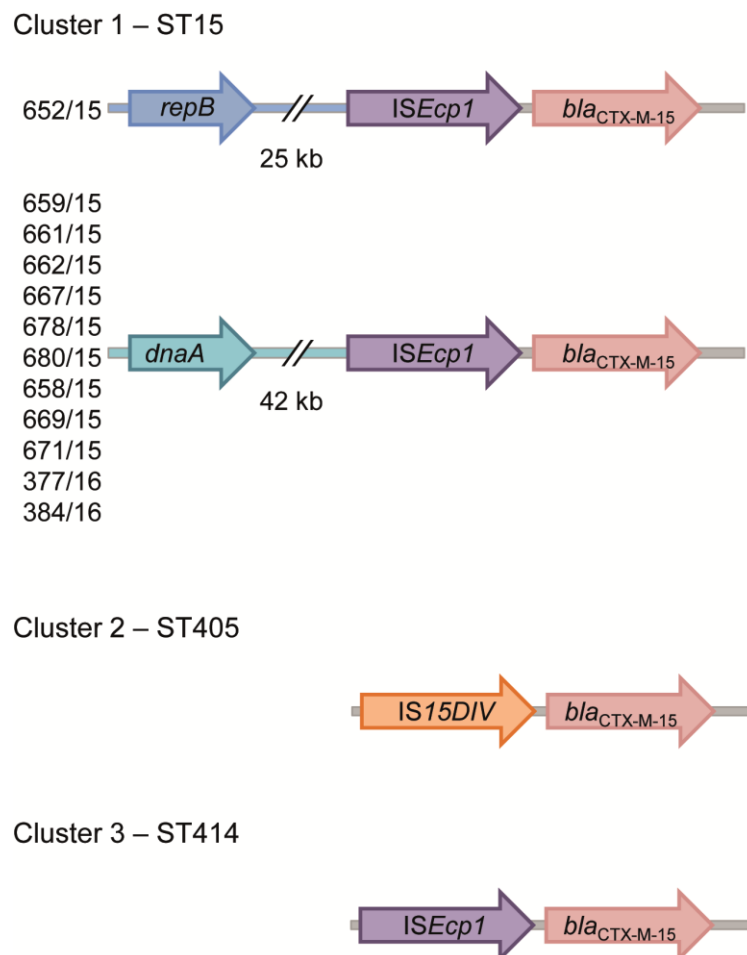


Abbildung 21 Schematische Darstellung der Region *upstream* des *bla*_{CTX-M-15}-Gens

Dargestellt sind die *upstream* des *bla*_{CTX-M-15}-Gens identifizierten Transposase-Gene sowie – soweit vorhanden – die für eine chromosomale (*dnaA*) bzw. plasmidale (*repB*) Lokalisation sprechenden Gene.

Für ein paralleles Vorkommen des *bla*_{CTX-M-15}-Gens auf Chromosom und Plasmid sprach die folgende Beobachtung: Beim *Mapping* der *Reads* auf das Transposase-Gen zeigten sich am 5'-Ende zwei Arten von *Reads*: (I) *Reads*, deren Sequenz *upstream* des mit dem Transposase-Gen alignierten Bereichs identisch zur Sequenz der *bla*_{CTX-M-15}-tragenden *Contigs* war, die dem Chromosom zugeordnet wurden, und (II) *Reads*, deren Sequenz *upstream* des mit dem Transposase-Gen alignierten Bereichs identisch

zur Sequenz des *Contigs* war, das dem Plasmid zugeordnet wurde (exemplarisch analysiert für 652/15 und 662/15).

Da sich durch *de novo-Assembly* für kein Isolat zwei *bla*_{CTX-M-15}-tragende *Contigs* rekonstruieren ließen, sollte das Vorkommen beider Varianten über PCRs nachgewiesen werden. Die Primer wurden so designt, dass jeweils ein Primer im *bla*_{CTX-M-15}-Gen und ein Primer im für das Chromosom bzw. das Plasmid spezifischen Bereich *upstream* der Transposase lag. Trotz Verwendung von insgesamt 11 verschiedenen Primerkombinationen unter verschiedenen PCR-Bedingungen war der Nachweis der Lokalisation des *bla*_{CTX-M-15}-Gens auf dem Plasmid über PCR nicht möglich. Auch der Nachweis der chromosomalen Integrationsstelle des *bla*_{CTX-M-15}-Gens über PCR war bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Es zeigte sich zwar teilweise eine Amplifikation des gewünschten Produkts, die Etablierung einer zuverlässigen PCR gelang bisher nicht.

4 Diskussion

4.1 Rekonstruktion der Ganzgenom-Sequenz des Isolats 234/12

Die vollständige Genomsequenz des *K. pneumoniae*-Isolats 234/12 konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus PacBio- und Miseq-Sequenzdaten rekonstruiert werden. Neben einem 5,3 Mb-großen Chromosom besaß das Isolat drei Plasmide der Größen 362 kb, 4,8 kb und 3,8 kb.

Rekonstruktion der Plasmidsequenzen

Das Vorhandensein eines mehrere 100 kb-großen Plasmids wurde bereits in der Doktorarbeit von Christoph Eller beschrieben (Eller, 2014). Hier zeigte sich in der S1-PFGE eine Bande auf der Höhe von ca. 360 kb, was die nun rekonstruierte Plasmidsequenz mit einer Größe von 362 kb bestätigt. Das Vorhandensein weiterer Plasmide wurde in dieser Arbeit jedoch nicht beschrieben. Aufgrund ihrer Größe waren das 4,8 kb- und das 3,8 kb-Plasmid in der S1-PFGE nicht nachweisbar. Die S1-PFGE wird eingesetzt, um die Größe großer Plasmide (>100 kb) zu bestimmen (Barton et al., 1995). Je nach Protokoll bzw. Laufzeit des Gels sind Plasmide mit Größen unter 20 kb-50 kb nicht detektierbar, weil sie aus dem Gel herauslaufen. Um Aussagen über den Gesamtgehalt an Plasmiden treffen zu können, ist es daher sinnvoll neben der S1-PFGE zum Nachweis großer Plasmide, extrahierte Plasmid-DNA in einer herkömmlichen Gelelektrophorese aufzutrennen.

Die Rekonstruktion des 3,8 kb-Plasmids aus den PacBio-Daten war nicht möglich (siehe 3.1.2). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Größe der vorhandenen *Reads* gewesen sein. Assembliert wurden die PacBio-Rohdaten unter Verwendung von HGAP.3. Die HGAP-Assemblierungsstrategie umfasst drei Schritte: (I) *Preassembly*, (II) *Assembly* und (III) *Consensus-Polishing* (Chin et al., 2013). Für das *Preassembly* werden die längsten *Reads* ausgewählt und als sogenannte *Seed Reads* verwendet. Die verbleibenden, kleineren *Reads* werden zur Korrektur der *Seeds Reads* gegen diese aligniert. Anschließend werden die korrigierten *Seed Reads de novo* assembliert (Chin et al., 2013). Demnach wäre es denkbar, dass das 3,8 kb-Plasmid nicht assembliert wurde, weil die vorhandenen *Reads* zu klein waren und sich deshalb unter den *Seed Reads* kein *Read* befand, von dem ausgehend das Plasmid assembliert werden konnte. Entsprechend wäre es zu empfehlen, bei Vorhandensein kleiner Plasmide, die Länge der *Seed Reads* anzupassen. Außerdem sollte, wenn bekannt ist, dass kleine Plasmide vorhanden sind und diese aus den PacBio-Daten rekonstruiert werden sollen, bedacht werden, dass eine Größenselektion während der *Library*-Herstellung zum Verlust der Plasmid-DNA führen kann (Galetti et al., 2016). In unserem Fall kommt ein möglicher Verlust von Plasmid-DNA während der *Library*-Herstellung aufgrund einer Größenselektion jedoch nicht als Erklärung in Betracht, da keine Größenselektion durchgeführt wurde.

Charakterisierung des Isolats 234/12 ausgehend von der Genomsequenz

Die durch diese Arbeit vollständig vorliegende Genomsequenz bestätigt die in der Arbeit von Christoph Eller beschriebenen Eigenschaften des Isolats 234/12 hinsichtlich Sequenztyp und Gehalt an Resistenz- und Virulenzgenen (Eller, 2014). Zusätzlich zeigten sich im 362 kb-Plasmid das Sulfonamid-Resistenz-vermittelnde Gen *sul2* und das Trimethoprim-Resistenz-vermittelnde Gen *dfrAI*, sodass jetzt alle phänotypisch beobachteten Resistenzen aus den Genomdaten erklärt werden können. Die Vermutung, dass es sich bei dem großen Plasmid um ein Multireplikon-Plasmid handelt, bestätigte sich angesichts der ringgeschlossenen Sequenz des 362 kb-Plasmids.

Aus der Sequenz des Chromosoms ließ sich auch die *wzi*-Sequenz (*wzi_433*) ableiten. In der *wzi*-Datenbank des Pasteur-Instituts ist für das Allel *wzi_433* bisher kein assoziierter Kapseltyp hinterlegt. Allerdings wurde der Kapseltyp des Isolats 234/12 als Teil der Ausbruchsanalyse bestimmt (Haller et al., 2015), sodass dem *wzi*-Allel 433 nun der Kapseltyp K33 zugeordnet werden kann.

Die Kombination von PacBio- und Miseq-Sequenzierung ermöglichte die erfolgreiche Rekonstruktion der gesamten Genomsequenz des *K. pneumoniae*-Isolats 234/12. Dieses Projekt bildete damit die Grundlage für die Verwendung des Isolats 234/12 im anschließenden Vergleich von DNA-Extraktionskits.

4.2 Vergleich sechs verschiedener DNA-Extraktionskits zur Isolierung bakterieller DNA für die anschließenden Miseq-Sequenzierung

Um den Einfluss der DNA-Extraktionsmethode auf die anschließende Miseq-Sequenzierung zu untersuchen, wurden insgesamt sechs verschiedene DNA-Extraktionskits verglichen. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausschließlich *K. pneumoniae*-Isolate analysiert wurden, wurde auch zur Bearbeitung dieses Teilprojekts ein *K. pneumoniae*-Isolat herangezogen. Ausgewählt für die Experimente wurde das klinische *K. pneumoniae*-Isolat 234/12, dessen Ganzgenom-Sequenz zuvor rekonstruiert worden war und das sich durch den Besitz von drei Plasmiden unterschiedlicher Größe auszeichnet.

Qualitätsparameter der *Libraries*

Die Wahl des Extraktionskits hatte keinen Einfluss auf die Qualität der *Libraries*. Die *Read*- und *Insert*-Längen sowie der Anteil von Basen mit Qualitätswerten von Q20 bzw. Q30 unterschieden sich nicht zwischen den verschiedenen Extraktionsmethoden (siehe 3.2.3). Auffällig war jedoch, dass *Read*- und *Insert*-Länge unabhängig vom verwendeten Kit fast identisch waren und die durchschnittliche *Read*-Länge für alle Kits unterhalb der angestrebten 300 Basenpaare lag. Dies deutet auf ein generelles Problem bei der Sequenzierung hin. Kurze DNA-Fragmente können durch eine zu starke Fragmentierung während der Tagmentierungsreaktion entstehen. Entscheidend für die Größe der Fragmente nach der Tagmentierung ist das Mengenverhältnis von Transposomen zu DNA (Head et al., 2014). So führt der Einsatz einer zu geringen DNA-Menge zu einer Übertagmentierung (Illumina Technical Support Note: Sequencing, Pub. No. 770-2015-015) und damit zu geringen *Insert*-Längen. Die *Insert*-Längen der hier sequenzierten *Libraries* waren zu gering, um die angestrebte *Read*-Länge von 300 Basenpaaren zu erreichen. Dass die ermittelten *Read*- und *Insert*-Längen nahezu identisch waren, deutet darauf hin, dass das gesamte Insert, d.h. der gesamte Bereich zwischen den Adaptern, sequenziert wurde und *Read* 1 und *Read* 2 sich also komplett überlappten. Durch geringe *Insert*-Längen geht ein nicht unerheblicher Teil an Sequenzinformation verloren. Im vorliegenden Fall lag die durchschnittliche *Read*-Länge bis zu 100 Basenpaare unter der angestrebten Länge. Um in Zukunft größere *Insert*-Längen zu erhalten und damit auch eine effizientere Sequenzierung zu ermöglichen, bietet sich einerseits eine Größenselektion zum Ausschluss kleiner DNA-Fragmente während der PCR-Aufreinigung über die AMPure-Beads (Bronner et al., 2014) und andererseits der Einsatz einer größeren DNA-Menge in der Tagmentierungsreaktion an (Illumina Technical Support Note: Sequencing, Pub. No. 770-2015-015).

(Sequencing) Coverage und Kopiezahl der verschiedenen Replikons

Ein Einfluss des verwendeten DNA-Extraktionskits auf die (Sequencing) Coverage des bakteriellen Chromosoms und des 362 kb-großen Plasmids wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet (siehe

3.2.5). Hingegen konnte gezeigt werden, dass die Wahl des DNA-Extraktionskits die *Coverage* der beiden kleinen Plasmide beeinflusste. So zeigte sich bei Verwendung von *salting-out*-basierten DNA-Extraktionskits (MasterPure und Wizard Genomic) eine verminderte *Coverage* der beiden kleinen Plasmide im Vergleich zum DNeasy Blood & Tissue Kit (siehe 3.2.5, Abbildung 8). Um die tatsächliche Kopiezahl der Plasmide zu bestimmen und damit beurteilen zu können, ob die beobachteten Unterschiede zwischen den beiden *salting-out*-Kits und dem DNeasy Blood Tissue Kit auf eine Anreicherung oder Abreicherung der kleinen Plasmide mit dem jeweiligen Kit zurückzuführen waren, wurden qPCR-Experimente durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die durch qPCR bestimmten Kopiezahlen der kleinen Plasmide niedriger waren als die aufgrund des Verhältnisses der *Coverage* berechneten Kopiezahlen ($\text{Plasmidkopiezahl} = \frac{\text{Coverage Plasmid}}{\text{Coverage Chromosom}}$). Der beobachtete Unterschied könnte auf ein Unterschätzen der Kopiezahl in den qPCR-Experimenten zurückzuführen sein. So ist beschrieben, dass die Konformation von Plasmid-DNA (*super-coiled*, linear) Einfluss auf das Ergebnis einer qPCR-basierten Kopiezahlbestimmung hat (Providenti et al., 2006). Bei Bestimmung der Kopiezahl nach Linearisierung der Plasmid-DNA durch einen Restriktionsverdau ergaben sich etwa doppelt so hohe Kopiezahlen wie vor dem Verdau (Providenti et al., 2006).

In unseren Analysen zeigten die beiden kleinen Plasmide höhere Kopiezahlen, wenn die DNA mit Matrix-basierten Kits isoliert wurde, als wenn die qPCR mit Koch-DNA durchgeführt wurde (siehe 3.2.7). Ein ähnliches Ergebnis beschreiben auch Providenti et al.: Die in Zell-Lysat bestimmte Kopiezahl eines ca. 2,5 kb-großen Plasmids war etwa dreimal niedriger als die unter Verwendung von aufgereinigter DNA bestimmte Kopiezahl (Zell-Lysat: Lyse mit 20 % Dimethylsulfoxid, aufgereinigte DNA: Kit basierend auf Silica-Säulen). Diese Beobachtung führen die Autoren auf das Vorliegen des Plasmids im Zell-Lysat in Assoziation mit Proteinen und/oder zellulären Strukturen zurück, die die Zugänglichkeit der DNA für die Primer in den ersten PCR-Zyklen erschweren. Die Möglichkeit einer Anreicherung von Plasmid-DNA in Folge der Kit-basierten Extraktion wird in der Studie von Providenti et al. nicht diskutiert. Dabei wurden für Silica-Oberflächen unterschiedliche Bindungsaffinitäten für lineare und *super-coiled* DNA beschrieben. Linear vorliegende DNA ist in ihrer Struktur flexibler und kann dadurch mehr Bindungen mit der Silica-Oberfläche eingehen (Melzak et al., 1996). Je mehr Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einer Silica-Oberfläche und der DNA vorliegen, desto mehr Energie wird im folgenden Desorptionsprozess, also bei der Elution, benötigt (Li et al., 2011). Die niedrigere Bindungskapazität von Anionenaustauscher-Säulen für große DNA-Moleküle (z.B. genomische DNA) als für kleine Plasmide (Budelier and Schorr, 2001) spricht für eine Anreicherung der kleinen Plasmide mit dem auf Anionenaustauscher-Säulen-basierenden Genomic-tip-Kit. Diese beiden Mechanismen könnten eine Anreicherung der kleinen Plasmide mit den Matrix-basierten Kits bewirkt haben und die im Vergleich zu den *salting-out*-Kits höhere

Coverage erklären. Die Abwesenheit von Bindungs- und Elutionsschritten im Protokoll der *salting-out*-basierten Kits, die einen Verlust bzw. Abreicherung einzelner Replikons erklären könnten, spricht ebenfalls für eine Anreicherung der kleinen Plasmide bei Verwendung von Matrix-basierten Kits.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit allen getesteten DNA-Extraktions-Kits eine zufriedenstellende Miseq-Sequenzierung möglich war. Die Wahl des Extraktionskits hatte keinen Einfluss auf die Qualität der Miseq-Rohdaten. Eine ausreichende und über das Replikon hinweg gleichmäßige *Coverage* wurde für alle vier Replikons unabhängig vom verwendeten Kit erreicht. In Fällen, wo Unterschiede in der *Coverage* kleiner Plasmide vernachlässigt werden können, kann daher die Wahl des DNA-Extraktionskits von anderen Faktoren, wie den Kosten, dem Zeitaufwand oder dem Potential zur Automatisierung abhängig gemacht werden.

4.3 Genomische Diversität Carbapenemase-produzierender *K. pneumoniae* in Deutschland

Über die Zusammensetzung der Population Carbapenemase-produzierender *K. pneumoniae* in Deutschland ist bisher wenig bekannt. Um einen Einblick in die Population zu erhalten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Genome von insgesamt 107 Carbapenemase-produzierenden Isolaten aus den Jahren 2008 bis 2014 sequenziert und analysiert.

Carbapenem-resistente *K. pneumoniae* zeigen eine weltweite Verbreitung. Innerhalb der Population Carbapenemase-produzierender *K. pneumoniae* treten einzelne Klone auf, die sich als besonders erfolgreich erwiesen haben (Pitout et al., 2015). Als prominenteste Vertreter international erfolgreicher Linien sind die zur klonalen Gruppe CG258 gehörenden Sequenztypen ST258, ST512, ST11, ST395 und ST340 zu nennen. Diese klonale Gruppe zeigte auch unter den deutschen sequenzierten Isolate eine hohe Präsenz. Die Analyse der 107 Isolate ergab zudem eine hohe Prävalenz der ebenfalls international verbreiteten Sequenztypen ST147 und ST101. Zwei der untersuchten Isolate konnten im Rahmen der Analyse der Spezies *K. variicola* zugeordnet werden. Außerdem konnte ein Isolat des Sequenztyps ST23 identifiziert werden, das eine außergewöhnlich hohe Zahl an Virulenzfaktoren besaß.

Einordnung der nachgewiesenen Sequenztypen

Insgesamt konnten innerhalb der Sammlung deutscher Isolate 21 verschiedene Sequenztypen nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich sowohl Vertreter weltweit verbreiteter und erfolgreicher Klone, als auch weitaus seltener beschriebene Sequenztypen. Mit insgesamt 58 Isolaten entfiel mehr als die Hälfte aller Isolate auf die klonale Gruppe CG258 (siehe 3.3.2, Abbildung 12 und 3.3.8, Abbildung 15). Weltweit gehört der überwiegende Teil KPC-produzierender *K. pneumoniae*-Isolate der klonalen Gruppe CG258 an, wobei ST258 und ST11 die häufigsten Sequenztypen sind (Chen et al., 2014b). Im Gegensatz zum Sequenztyp ST258, der sich in unserer Sammlung ausschließlich in Verbindung mit KPC-2/3 zeigte und für den es bislang auch keine Berichte über das Auftreten in Kombination mit OXA-48 und NDM-1 gibt, zeigen sich Vertreter des Sequenztyps ST11 in Assoziation mit verschiedenen Carbapenemasen (Lee et al., 2016a). Auch in unserem Fall lag das ST11-Isolat nicht in Kombination mit KPC, sondern mit OXA-48 vor. Die drei Isolate des Sequenztyps ST395 trugen ebenfalls das Carbapenemase-Gen *bla*_{OXA-48}. Berichte über *bla*_{OXA-48}-tragende ST395-Isolate liegen auch aus anderen europäischen Ländern, wie Frankreich, den Niederlanden und Ungarn sowie aus Marokko vor (Cuzon et al., 2011; Kovács et al., 2017; Liapis et al., 2014; Potron et al., 2011, 2013). Die beiden Isolate des Sequenztyps ST340 produzierten verschiedene Carbapenemasen. Sowohl das Vorkommen NDM-1-produzierender ST340-Isolate, als auch das Vorkommen KPC-2-produzierender Isolate wurde bereits in verschiedenen Ländern beschrieben (Gharout-Sait et al., 2014; Giakkoupi et al., 2011; Horna et al., 2017; Martins et al., 2015; Peirano et al., 2014; Pereira et al., 2013; Poiriel et al., 2011).

Auch bei dem Sequenztyp ST15, der in unserer Studie durch vier Isolate vertreten wurde, handelt es sich um einen weltweit verbreiteten und erfolgreichen Sequenztyp (siehe auch 4.4). Als Vertreter der klonalen Gruppe CG14/15 sind ST15-Isolate häufig mit ESBL- und verschiedenen Carbapenemase-Genen assoziiert, darunter auch die hier nachgewiesenen Gene *bla*_{NDM-1} und *bla*_{OXA-48}. (Wyres and Holt, 2016). Weiterhin zeigten sich die international verbreiteten Sequenztypen ST101 (n = 16) und ST147 (n = 13). Der Sequenztyp ST101 ist insbesondere in Europa weit verbreitet (Wyres and Holt, 2016). Dabei zeigt sich eine starke Assoziation mit der Carbapenemase OXA-48. So wurden OXA-48-produzierende Isolate des Sequenztyps ST101 in Frankreich, der Schweiz, Spanien, Tschechien, Bulgarien und auch in Deutschland beschrieben (Cubero et al., 2015; Hrabák et al., 2015; Kaase et al., 2016; Liapis et al., 2014; Markovska et al., 2015; Potron et al., 2013; Skálová et al., 2016). In unserer Sammlung waren ST101, ST147, ST395, ST1399 und ST15 die häufigsten Sequenztypen unter den OXA-48-produzierenden Isolaten. Bis auf ST1399 befanden sich diese auch unter den häufigsten Sequenztypen in einer Studie, in der die molekulare Epidemiologie OXA-48-produzierender *K. pneumoniae* in Frankreich untersucht wurde. Hier zeigten sich ST15, ST147, ST395, ST101 und ST405 als häufigste Sequenztypen (Liapis et al., 2014). Sowohl ST101 als auch ST147 traten, wenn auch deutlich seltener, in Kombination mit der Carbapenemase KPC-2 auf (n = 1 bzw. n = 3, siehe 3.3.2, Abbildung 12). Das Auftreten KPC-2 produzierender Isolate des Sequenztyps ST101 in Europa wurde bereits für Spanien (Oteo et al., 2013a, 2016; Pena et al., 2017) und Italien (Del Franco et al., 2015; Mezzatesta et al., 2013) beschrieben, während KPC-2-produzierende ST147-Isolate in Griechenland (Bathoorn et al., 2016; Giakkoupi et al., 2011), Italien (Richter et al., 2012) und auch in Deutschland (Kaase et al., 2016) nachgewiesen wurden. Auch in Kombination mit NDM-1 (n = 1 in unserer Sammlung) traten Isolate des Sequenztyps ST147 bereits in mehreren europäischen Ländern auf (Großbritannien (Giske et al., 2012), Finnland (Österblad et al., 2012) und Polen (Izdebski et al., 2015)).

Einige der Sequenztypen, die in unserer Sammlung nur durch ein bis zwei Isolate vertreten waren, weisen ebenfalls eine internationale Verbreitung auf. So konnten CTX-M-15- und Carbapenemase-produzierende Vertreter des Sequenztyps ST16 bisher in vielen europäischen Ländern, sowie in Nord- und Südamerika nachgewiesen werden (siehe Tabelle 11). Auch das Vorkommen von *bla*_{NDM-1}- bzw. *bla*_{OXA-48}-positiven ST16-Isolaten in Europa wurde bereits beschrieben (Kocsis et al., 2016; Oteo et al., 2013b). Multiresistente Vertreter des Sequenztyps ST17 wurden ebenfalls in mehreren europäischen Ländern und in Amerika identifiziert. Außerdem zeigten sie sich in Asien und Afrika (siehe Tabelle 11). Das Auftreten OXA-48-produzierender ST17-Isolate in Europa (Frankreich und Deutschland) wurde ebenfalls beschrieben (Kaase et al., 2016; Liapis et al., 2014). *K. pneumoniae*-Isolate des Sequenztyps ST37 wurden in Kombination mit verschiedenen ESBL-, AmpC- und Carbapenemase-Genen in Europa, Nordamerika und Asien nachgewiesen (siehe Tabelle 11). In Kombination mit KPC-

3 wurden ST37-Isolate bisher für Europa nur in Italien beschrieben (Richter et al., 2012). Vertreter des Sequenztyps ST307, der in unserer Sammlung ebenfalls nur einmal auftrat, wurden in Kombination mit EBSL- bzw. Carbapenemase-Genen in Europa, Nordamerika, Afrika und Asien nachgewiesen. OXA-48-produzierende Isolate zeigten sich in Europa bereits in Frankreich und Spanien (Liapis et al., 2014; Potron et al., 2013; Ruiz-Garbajosa et al., 2016). Isolate des Sequenztyps ST48 zeigen in Kombination mit ESBL-, AmpC- und Carbapenemase-Genen eine weltweite Verbreitung. Das Auftreten OXA-48-produzierender ST48-Isolate wurde bereits aus Frankreich berichtet (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11 Internationale Verbreitung der in Deutschland identifizierten *K. pneumoniae*-Sequenztypen

Angegeben ist, soweit aus der genannten Quelle zu entnehmen, das Beta-Laktamase-Gen bzw. der Resistenzphänotyp. Fett gedruckte Resistenzgene zeigen an, dass dieses Gen auch in unserer Sammlung in Isolatzen des entsprechenden Sequenztyps nachgewiesen wurde. Nicht aufgelistet sind die Sequenztypen: ST11, ST15, ST23, ST101, ST147, ST258, ST340, ST395, ST512, ST784, ST2254.

Sequenztyp	Resistenz	Land (Referenz)
ST16 (n = 2)	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	Frankreich (Baraniak et al., 2013; Marcade et al., 2012), Dänemark (Bojer et al., 2012; Nielsen et al., 2011), Schweden (Sandegren et al., 2012), Uruguay (Bado et al., 2016), Italien und Israel (Baraniak et al., 2013)
	<i>bla</i> _{KPC}	Israel (Adler et al., 2015)
	<i>bla</i> _{KPC-2}	Brasilien (Seki et al., 2011)
	<i>bla</i>_{NDM-1}	Kanada (Peirano et al., 2014), Kroatien (Kocsis et al., 2016)
	<i>bla</i> _{NDM-5}	Niederlande (Bathoorn et al., 2015), Dänemark (Hammerum et al., 2017)
	<i>bla</i>_{OXA-48}	Spanien (Oteo et al., 2013b), Türkei (Potron et al., 2013)
	<i>bla</i> _{OXA-370}	Brasilien (Pereira et al., 2015)
ST17 (n = 1)	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	Japan (Nagasaka et al., 2015)
	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	Norwegen (Löhr et al., 2015), Kanada (Peirano et al., 2012), Israel (Baraniak et al., 2013)
	<i>bla</i> _{KPC-2}	Griechenland (Giakkoupi et al., 2011; Pantelidou et al., 2015)
	<i>bla</i> _{NDM-1}	Ägypten (Gamal et al., 2016), China (Jin et al., 2015; Zhang et al., 2015)
	<i>bla</i>_{OXA-48}	Frankreich (Liapis et al., 2014), Deutschland (Kaase et al., 2016)
	<i>bla</i> _{OXA-181}	Singapur (Balm et al., 2013)
	<i>bla</i> _{OXA-370}	Brasilien (Aires et al., 2016)
	<i>bla</i> _{VIM}	Griechenland (Pantelidou et al., 2015)
	Carbapenem-resistent	USA (Cerqueira et al., 2016), Griechenland und Türkei (Lascols et al., 2013)
ST37 (n = 1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	Taiwan (Yan et al., 2015)
	<i>bla</i> _{DHA-1}	USA (Guo et al., 2016), Frankreich (Illiaquer et al., 2012), Spanien (Diestra et al., 2011)
	<i>bla</i> _{KPC}	Israel (Adler et al., 2015)
	<i>bla</i> _{KPC-2}	Kroatien (Bedenić et al., 2012), China (Liu et al., 2015; Yang et al., 2013),
	<i>bla</i>_{KPC-3}	USA (Clancy et al., 2013), Italien (Richter et al., 2012)
	<i>bla</i> _{NDM-1}	China (Zhu et al., 2015, 2016), USA (Pannaraj et al., 2015)
	<i>bla</i> _{OXA-48}	Thailand (Lunha et al., 2017), Saudi-Arabien (uz Zaman et al., 2014), Frankreich (Liapis et al., 2014; Potron et al., 2013)
	Carbapenem-resistent	USA (Cerqueira et al., 2016; Diago-Navarro et al., 2014),
	Colistin-resistent	Südkorea (Suh et al., 2010)
	ESBL/AmpC	Japan (Nagasaka et al., 2015), Italien (Orsi et al., 2011, 2013)

ST48 (n = 1)

<i>bla</i> _{CTX-M-15}	Korea (Ahn et al., 2016a)
<i>bla</i> _{DHA-1}	Frankreich (Compain et al., 2014)
<i>bla</i>_{OXA-48}	Frankreich (Liapis et al., 2014)
<i>bla</i> _{TEM-3}	Frankreich (Marcade et al., 2012)
Carbapenem-resistent	Taiwan (Pan et al., 2015), Thailand (Netikul and Kiratisin, 2015)
ESBL/AmpC	Uruguay (Bado et al., 2016), Taiwan (Lin et al., 2016), Irland (Ludden et al., 2015; Morris et al., 2015), Neuseeland (Freeman et al., 2014), Korea (Shin and Soo Ko, 2014), Tansania (Mshana et al., 2013), Kuba (Quiñones et al., 2014), Taiwan (Ma et al., 2013)

ST307 (n = 1)

<i>bla</i> _{KPC}	Korea (Ahn et al., 2016b)*
<i>bla</i> _{KPC-2}	Südkorea (Kim et al., 2017), USA (Castanheira et al., 2013), Italien (Richter et al., 2012)
<i>bla</i> _{KPC-3}	Italien (Bonura et al., 2015; Calia et al., 2017; Gona et al., 2014)
<i>bla</i> _{NDM-1}	Indien (Giske et al., 2012)
<i>bla</i>_{OXA-48}	Algerien (Aggoune et al., 2014), Spanien (Ruiz-Garbajosa et al., 2016), Serbien (Novović et al., 2017), Frankreich (Liapis et al., 2014; Potron et al., 2013)
<i>bla</i> _{VIM-1}	Italien (Calia et al., 2017)
ESBL	USA (Marsh et al., 2015), Pakistan (Habeeb et al., 2013)

ST391 (n = 1)

<i>bla</i> _{NDM-1}	Indien (Lascols et al., 2011)
-----------------------------	-------------------------------

ST629 (n = 1)

-	USA (Little et al., 2014)
<i>bla</i> _{CTX-M-65}	China (Xiao et al., 2017)
Carbapenem-resistent	China (Ning et al., 2015)*

ST1399 (n = 3)

<i>bla</i> _{NDM-1}	Jemen (Gharout-Sait et al., 2014)
-----------------------------	-----------------------------------

* Angaben wurde dem englischen Abstract entnommen, Artikel nicht in englischer Sprache verfügbar

Zu den bisher selten beschriebenen Sequenztypen gehörten ST784 (KPC-2, n = 1), ST2254 (OXA-48, n = 1), ST1399 (OXA-48, n = 3), ST391 (OXA-48, n = 1) und ST629 (OXA-48, n = 1). Berichte über den Nachweis von *K. pneumoniae*-Isolaten des Sequenztyps ST784 finden sich in der Literatur nicht. Den einzigen Hinweis auf das Vorkommen dieses Sequenztyps in Europa liefert das in der MLST-Datenbank hinterlegte Isolat (Zugangsnummer 839). Es wurde im Jahr 2010 in den Niederlanden isoliert. Der Sequenztyp ST2254 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals identifiziert und in der Datenbank hinterlegt, entsprechend findet sich auch hier keine Literatur zum Vorkommen dieses Sequenztyps. Drei OXA-48-produzierende Isolate unserer Sammlung wurden dem Sequenztyp ST1399 zugeordnet. Da zwei der Isolate aus Brandenburg stammten, allerdings aus verschiedenen Jahren und Orten, während das dritte Isolat aus Hamburg stammte, erscheint eine epidemiologische Verbindung der Isolate unwahrscheinlich. In der Literatur gibt es keine Hinweise auf das Vorkommen dieses Sequenztyps in Europa und in Kombination mit OXA-48. Es findet sich lediglich ein Bericht über das Auftreten NDM-1-produzierender ST1399-Isolate im Jemen (Gharout-Sait et al., 2014). Auch zum Sequenztyp ST391 findet sich nur ein Bericht. Hier wird von einem NDM-1-produzierenden

Isolat aus Indien berichtet (Lascols et al., 2011). Das Vorkommen von Isolaten des Sequenztyps ST629 wurde aus China und den USA berichtet (Little et al., 2014; Xiao et al., 2017). In der MLST-Datenbank sind zudem zwei ESBL-produzierende Isolate aus Japan hinterlegt (Zugangsnummern 1439 und 1441). Auch in Deutschland wurde der Sequenztyp ST629 bereits nachgewiesen. Dieses Isolat findet sich ebenfalls in der MLST-Datenbank (Zugangsnummer 703). Allerdings gibt es keinen Bericht über das Vorkommen dieser Sequenztyp-Kombination mit der Carbapenemase OXA-48.

Die Kapseldiversität der ST258/ST512-Isolate

Die Kapsel von *K. pneumoniae* ist ein wichtiger Virulenzfaktor. Das für die Ausbildung der Kapsel verantwortliche *cps*-Gencluster weist aufgrund von horizontalem Gentransfer und Rekombinationserreignissen eine große Diversität auf (Wyres and Holt, 2016). Zur Kapseltypisierung wurde in Rahmen der vorliegenden Arbeit das *wzi*-Gen analysiert. In den ST258-Isolaten (unsere Sammlung und internationale Isolate) konnten vier verschiedene *wzi*-Allele nachgewiesen werden, nämlich *wzi*₂₉ (n = 26), *wzi*₁₅₄ (n = 4), *wzi*₈₃ (n = 1) und *wzi*₁₅₀ (n = 1). Ähnliche Verteilungen wurden auch in zwei Studien aus den USA beobachtet. Die KPC-2-positiven ST258-Isolate der ersten Studie verteilten sich auf die Allele *wzi*₂₉ (n = 5), *wzi*₅₀ (n = 2), *wzi*₈₃ (n = 2), *wzi*₁₅₀ (n = 6), *wzi*₁₅₃ (n = 1) und *wzi*₁₅₄ (n = 2) (Diago-Navarro et al., 2014). In den 14 KPC-3-positiven Isolaten wurden nur zwei verschiedene Allele nachgewiesen, nämlich *wzi*₁₅₄ (n = 13) und *wzi*₅₀ (n = 1) (Diago-Navarro et al., 2014). Bei der Untersuchung von 272 *K. pneumoniae*-Isolaten aus Blutstrominfektionen (Studie 2) wiesen bis auf ein Isolat alle KPC-3-produzierenden ST258-Isolate das *wzi*-Allel 154 auf (n = 12) (Gomez-Simmonds et al., 2015). Die restlichen KPC-produzierenden ST258-Isolate zeigten neben den auch in unserer Studie nachgewiesenen Allelen (*wzi*₂₉, *wzi*₈₃ und *wzi*₁₅₀), ein weiteres Allel (*wzi*₅₀) (Gomez-Simmonds et al., 2015). Die Assoziation von *cps1/wzi*₂₉ mit dem *bla*_{KPC-2}-Gen bzw. von *cps2/wzi*₁₅₄ mit dem *bla*_{KPC-3}-Gen für Isolate der ST258-Linie wurde auch von weiteren Arbeitsgruppen beobachtet (Bowers et al., 2015; Chen et al., 2014c; Conte et al., 2016) und zeigte sich auch für die in dieser Arbeit untersuchten Isolate. Bowers et al. vermuten, dass diese Korrelation, also das Auftreten von *cps1* in KPC-2-positiven Isolaten und das Auftreten von *cps2* in KPC-3-positiven Isolaten, darauf zurückzuführen ist, dass die Punktmutation im *bla*_{KPC}-Gen etwa zeitgleich zu dem Rekombinationserreignis auftrat, das die Entstehung der zwei Klade mit verschiedenen *cps*-Loci zur Folge hatte (Bowers et al., 2015). Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isolate des Sequenztyps ST512 trugen das *bla*_{KPC-3}-Gen und wiesen – wie alle *bla*_{KPC-3}-positiven Isolate des Sequenztyps ST258 – das *wzi*-Allel 154 auf. Unsere Analysen bestätigen damit die Ergebnisse von Conte et al., die bei der Untersuchung von italienischen KPC-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolaten in allen 112 *bla*_{KPC-3}-positiven ST512-Isolaten das *wzi*-Allel 154 nachweisen konnten (Conte et al., 2016). Die Autoren sehen das ausschließliche Vorkommen von

ST512 mit dem *wzi*-Allel 154 als Hinweis darauf, dass der Sequenztyp ST512 aus der ST258-*cps2*-Klade entstanden sein könnte (Conte et al., 2016).

Carbapenemase-produzierende *K. variicola*

Zwei der sequenzierten *Klebsiella*-Isolate konnten aufgrund des Vorhandenseins des chromosomalen Beta-Laktamase-Gens *bla_{LEN}* und der Analyse des *gyrA*-Gens als Vertreter der Phylogruppe KpIII bzw. der Spezies *K. variicola* identifiziert werden (siehe 3.3.7). Für *K. variicola* wird dasselbe MLST-Schema verwendet wie für *K. pneumoniae* und *K. quasipneumoniae* (Wyres and Holt, 2016). Das KPC-2-produzierende *K. variicola*-Isolat wurde dem Sequenztyp ST347 zugeordnet, während das OXA-48-produzierende Isolat dem Sequenztyp ST906 zugeordnet werden konnte.

Beschreibungen des Sequenztyps ST906 sind sehr selten. So wurde im Rahmen einer Studie, in der die Genome von knapp 1 900 *Klebsiella*-Isolaten aus den USA sequenziert wurden, ein NDM-1-produzierendes ST906-Isolat identifiziert und der Spezies *K. variicola* zugeordnet (Long et al., 2017). Diese Studie wurde nach Abschluss unserer Analysen veröffentlicht und bestätigt somit unsere Zuordnung. Weiterhin findet sich eine Studie, in der von einem SHV-12-produzierenden ST906-Isolat berichtet wird (Baraniak et al., 2013). Das Isolat stammt aus einem israelischen Krankenhaus und der Sequenztyp ST906 wurde im Rahmen dieser Studie neu identifiziert. Informationen zum einer möglichen Zugehörigkeit dieses Sequenztyps zur Spezies *K. variicola* finden sich in dieser Publikation nicht. Die Isolate der genannten Studie wurden PCR-basiert auf verschiedene Resistenzgene untersucht (*bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CMY-2}*, und *bla_{DHA}*-ähnlich), allerdings wurden die PCRs mit der DNA von *E. coli*-Transkonjuganten durchgeführt (Baraniak et al., 2013; Empel et al., 2008). Der Nachweis chromosomal vorliegender Gene der Donorstämme war damit nicht möglich und so ist davon auszugehen, dass das nachgewiesene *bla_{SHV-12}*-Gen auf einem Plasmid vorlag. Das Vorkommen eines plasmid-codierten *bla_{SHV}*-Gens neben dem chromosomal-codierten *bla_{LEN}*-Gen ist für *K. variicola*-Isolate nicht ungewöhnlich (Long et al., 2017).

Isolate des Sequenztyps ST347 wurden in mehreren Studien nachgewiesen. Zwei Isolate wurden in Japan (Ito et al., 2015) und jeweils ein Isolat wurde in China, Griechenland und Schweden identifiziert (Maatallah et al., 2014; Pantelidou et al., 2015; Xiao et al., 2017). Unsere Zuordnung des Sequenztyps ST347 zur Spezies *K. variicola* wird durch die schwedische Studie bestätigt. Die Untersuchungen zur Phylogruppen-Zugehörigkeit ordneten das ST347-Isolat ebenfalls der Phylogruppe KpIII zu (Maatallah et al., 2014). Eine Carbapenem-Resistenz zeigte sich nur für das griechische ST347-Isolat. Dabei wies dieses Isolat, wie unser ST347-Isolat, das Carbapenemase-Gen *bla_{KPC-2}* auf (Pantelidou et al., 2015).

Insgesamt gibt es wenige Berichte von Carbapenem-resistenten *K. variicola*-Isolaten. In nur zwei weiteren Fällen konnten Carbapenemase-produzierende *K. variicola*-Isolate nachgewiesen werden.

Ein OXA-181-produzierendes *K. variicola*-Isolat wurde auf in die Schweiz importiertem Koriander (Herkunft Thailand/Vietnam) nachgewiesen (Zurfluh et al., 2015) und drei NDM-9-produzierende *K. variicola*-Isolate konnten aus einem Fluss in Südkorea isoliert werden (Di et al., 2017). Für die wenigen Berichte über (Carbapenem-resistente) *K. variicola*-Isolate in der Klinik kommen verschiedene Gründe in Betracht. Einerseits betrug der Anteil von KpIII an der *K. pneumoniae* (*sensu lato*)-Population je nach Studie nur zwischen 8 bis 24 % (Brisse et al., 2004a; Maatallah et al., 2014; De Melo et al., 2011). Andererseits wiesen *K. variicola*-Isolate im Vergleich zu *K. pneumoniae* weniger Antibiotikaresistenzen auf, d.h. sie zeigten sich seltener als multiresistente Erreger und waren seltener mit ESBL-Genen assoziiert (Brisse et al., 2004a; Holt et al., 2015; Maatallah et al., 2014; De Melo et al., 2011). Die höheren Resistenzraten von *K. pneumoniae* könnten wiederum die höhere Prävalenz von *K. pneumoniae*-Isolaten in der Klinik erklären (Brisse et al., 2004a). Aufgrund der in den meisten Fällen fehlenden genotypischen Differenzierung muss zudem davon ausgegangen werden, dass sich unter den in der klinischen Mikrobiologie als *K. pneumoniae* identifizierten Isolaten unentdeckte *K. variicola*-Isolate befinden (Maatallah et al., 2014).

OXA-48-produzierende *K. pneumoniae* des Sequenztyps ST23

Ein Carbapenemase-produzierendes *K. pneumoniae*-Isolat konnte dem Sequenztyp ST23 zugeordnet werden. Der Sequenztyp ST23 gilt als Hauptvertreter hypervirulenter *K. pneumoniae* (Shon et al., 2013). Entsprechend zeichnen sich Vertreter des Sequenztyps ST23 meist durch eine ausgeprägte Virulenz und/oder die Ausbildung einer sogenannten Hyperkapsel (*hypercapsule*), die einen hypermukoviskösen Phänotypen zur Folge hat, aus. Für Isolate des Sequenztyps ST23 ist eine starke Assoziation mit Leberabzessen beschrieben (Shon et al., 2013). Informationen zur Krankengeschichte des Patienten, von dem das hier beschriebene OXA-48-produzierende ST23-Isolat stammte, lagen uns nicht vor. Die Tatsache, dass das Isolat aus Trachealsekret isoliert wurde (siehe Tabelle A 1 im Anhang), deutet allerdings auf das Vorliegen einer Lungenentzündung hin. (Ambulant-erworbene) Pneumonien gehören ebenfalls zu den von hypervirulenten *K. pneumoniae* verursachten Krankheitsbildern (Shon et al., 2013). Hypervirulente *K. pneumoniae* sind in der Lage auch in gesunden Menschen schwere Infektionen hervorzurufen. Diese Infektionen werden meist ambulant erworben. Abgesehen von der Resistenz gegenüber Ampicillin ist die Mehrheit der hypervirulenten *K. pneumoniae*-Isolate empfindlich gegenüber den meisten Antibiotika (Shon et al., 2013).

Das ST23-Isolat unserer Sammlung wies neben dem Carbapenemase-Gen *bla*_{OXA-48}, die Beta-Laktamase-Gene *bla*_{SHV-11}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1} und *bla*_{OXA-1} auf. Bisher gibt es nur wenige Berichte über das Auftreten Carbapenemase-produzierender *K. pneumoniae*-Isolate des Sequenztyps ST23. Nach eingehender Literaturrecherche fand sich in einer Arbeit die Erwähnung eines OXA-48-produzierenden *K. pneumoniae*-Stamms des Sequenztyps ST23. Dabei diente das OXA-48-

produzierende ST23-Isolat als Negativkontrolle für eine PCR (López-Camacho et al., 2014). Für die Herkunft dieses Isolats wird auf eine Publikation verwiesen, in der ein *K. pneumoniae*-Ausbruch (ST405, OXA-48) in Spanien im Jahr 2011 beschrieben wird (Paño-Pardo et al., 2013). Informationen über den Gehalt an Virulenzgenen dieses Isolates liegen nicht vor. Auch der Nachweis anderer Carbapenemasen in ST23-Isolaten wurde bisher nur selten beschrieben. So finden sich fünf Berichte über das Auftreten KPC-2-produzierender *K. pneumoniae*-Isolate des Sequenztyps ST23 in China (Cheng et al., 2016a; Qi et al., 2010, 2011, Zhang et al., 2014, 2016), ein Bericht über das Auftreten eines KPC-2-produzierenden ST23-Isolat in Polen (Baraniak et al., 2011) und ein Bericht über ein KPC-2-produzierendes ST23-Isolat in Argentinien (Cejas et al., 2014). Der Gehalt an Virulenzgenen bzw. das Vorkommen eines hypermukoviskösen Phänotyps wurde nur in der argentinischen Arbeit und in zwei Berichten aus China untersucht. In diesen Fällen konnten die beiden mit einem virulenten Phänotyp assoziierten Gene *rmpA* und *magA* (*wzY_{KpK1}*) nachgewiesen werden (Cejas et al., 2014; Zhang et al., 2014, 2016). Das *magA*-Gen wird als Marker für *K. pneumoniae* des Kapseltyps K1 verwendet (Struve et al., 2005). Das argentinische Isolat und zwei chinesische Isolate erwiesen sich zudem im *String-Test* als hypermukoviskös (Cejas et al., 2014; Zhang et al., 2016). Auch das im Rahmen dieser Arbeit identifizierte ST23-Isolat konnte dem Kapseltyp K1 zugeordnet werden. Ein hypermukovisköser Phänotyp zeigte sich hingegen nicht (siehe 3.3.4). Sowohl das *rmpA*-, als auch das *rmpA2*-Gen konnten in unserem Isolat nachgewiesen werden. Allerdings wies das *rmpA2*-Gen eine Deletion und in der Folge ein vorzeitiges Stoppcodon auf. Der fehlende hypermukovisköse Phänotyp des OXA-48-produzierenden Isolats lässt sich jedoch nicht durch die Mutation im *rmpA2*-Gen erklären. So sind Mutationen in den Genen des *rmpA*-Systems zwar als Ursache für einen nicht vorhandenen hypermukoviskösen Phänotyp bei Vorhandensein des *rmpA*- und/oder des *rmpA2*-Gens beschrieben, es zeigten sich aber stets Mutationen in beiden Genen bzw. in dem jeweils vorhandenen Gen (Yu et al., 2015). Zudem wurde bei Vorhandensein eines intakten *rmpA*-Gens trotz Veränderungen im *rmpA2*-Gen ein hypermukovisköser Phänotyp beobachtet (Yu et al., 2015).

Neben den bereits genannten Virulenzfaktoren wurden die folgenden Virulenzgene bzw. Virulenzgencluster im OXA-48-produzierenden ST23-Isolat nachgewiesen: *mrk*, Yersiniabactin, Allantoinase, Colibactin, Salmochelin, Aerobactin, *kfu* und Microcin (siehe Tabelle 8). Dieser hohe Gehalt an Virulenzgenen in Isolaten des Sequenztyps ST23 deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien. Die elf ST23-Isolate, die in der Studie von Holt *et al.* untersucht wurden, wiesen alle die Virulenzfaktoren Yersiniabactin, Aerobactin, Salmochelin, *kfu* und Allantoinase auf. Colibactin und Microcin wurden in 10 bzw. 8 von 11 Isolaten nachgewiesen. Wie auch für unser Isolat beobachtet, war *kvg* in keinem der Isolate vorhanden (Holt et al., 2015). Auch bei der Untersuchung von 13 Isolaten des Sequenztyps ST23 aus Singapur zeigten alle Isolate das Vorkommen von *kfu*, Aerobactin,

Salmochelin und Allantoinase und zwölf Isolate das Vorkommen von Yersiniabactin (Lee et al., 2016b).

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit identifizierten *K. pneumoniae*-Isolat des Sequenztyps ST23 handelt es sich um das erste OXA-48-produzierende ST23-Isolat, bei dem eine Vielzahl an Virulenzgenen nachgewiesen werden konnte. Auch wenn bisher keine Experimente hinsichtlich der phänotypischen Virulenz durchgeführt wurden, lässt der hohe Gehalt an Virulenzgenen eine erhöhte Virulenz vermuten und zeigt, dass auch in Deutschland das Auftreten von *K. pneumoniae*-Isolaten, die sich sowohl durch eine ausgeprägte Antibiotikaresistenz, als auch durch großen Gehalt an Virulenzgenen auszeichnen, bereits Realität ist. Eine angesichts dieser Ergebnisse veranlasste Suche nach Isolaten mit einem ähnlichen PFGE-Profil in der Datenbank des NRZ ergab, dass das hier beschriebene Isolat Teil eines Clusters von mindestens sechs weiteren Isolaten war und zwei weitere im PFGE-Profil ähnliche Isolate von anderen Einrichtungen eingesendet wurden (Sören Gattermann, NRZ, persönliche Mitteilung).

Virulenzgen-Gehalt der Carbapenemase-produzierenden Isolate

Mit Ausnahme des ST23-Isolats zeigte keines der untersuchten Isolate einen außergewöhnlich hohen Gehalt an Virulenzgenen. Das in den 107 Carbapenemase-produzierenden Isolaten am häufigsten nachgewiesene Virulenzgencluster *mrk* (siehe Abbildung 13) zeigte auch in anderen Studien eine weite Verbreitung und wurde sowohl in klassischen, als auch in hypervirulenten Isolaten nachgewiesen (Bialek-Davenet et al., 2014a; Holt et al., 2015). Für drei Gene des Clusters (*mrkH*, *mrkI* und *mrkJ*) ist eine regulatorische Funktion beschrieben. Dabei haben MrkH und MrkI einen positiven Einfluss auf die Expression (Johnson et al., 2011), während MrkJ zu einer Reduktion der Expression führt (Johnson and Clegg, 2010). Folglich dürfte die Insertion eines Transposase-Gens, wie für 28 Isolate unserer Sammlung im *mrkH*-Gen bzw. in einem Isolat im *mrkH*- und *mrkI*-Gen beobachtet (siehe 3.3.4), eine Reduktion der Fimbrienausbildung zur Folge haben. Die in einem anderen Isolat nachgewiesene Insertion im *mrkJ*-Gen hingegen lässt eine gesteigerte Fimbrien- und Biofilm-Bildung dieses Isolats vermuten (Johnson and Clegg, 2010).

Ebenfalls in mehreren Isolaten nachgewiesen wurden die Gene der beiden Siderophor-Systeme Yersiniabactin (36 %) und Aerobactin (6 %) (siehe Abbildung 13). Während Yersiniabactin in etwa der Hälfte der klassischen *K. pneumoniae*-Isolate vorkommt, tritt Aerobactin überwiegend in hypervirulenten Isolaten auf und kommt selten in klassischen Isolaten vor (Paczosa and Mecsas, 2016). Das Vorhandensein von Yersiniabactin in multiresistenten Klonen (CG258, ST14, ST15) wird mit Sorge beobachtet (Holt et al., 2015). Einerseits, weil Yersiniabactin stark mit dem Auftreten von Infektionen assoziiert ist und andererseits, weil der Erwerb von Yersiniabactin offenbar häufig der erste Schritt zum Erwerb weiterer Siderophor-Systeme ist (Holt et al., 2015). So wiesen auch in

unserer Sammlung alle Isolate, in denen das Aerobactin-Gencluster nachgewiesen wurde, gleichzeitig das Gencluster für Yersiniabactin auf.

Das Eisentransportsystem *Kfu* zeigte sich nicht nur in *K. pneumoniae*-Isolaten, sondern auch in einem der zwei *K. variicola*-Isolate unserer Sammlung. Das Auftreten des *kfu*-Genclusters in *K. variicola*-Isolaten wurde auch in der Studie von Holt et al. beobachtet (Holt et al., 2015). Das *kfu*-Gencluster konnte in 75 % der *K. variicola*-Isolate nachgewiesen werden und zeigte damit eine höhere Prävalenz in *K. variicola*-Isolaten als in *K. pneumoniae*-Isolaten (20 %) (Holt et al., 2015). Unsere Ergebnisse – alle untersuchten ST15-Isolate wiesen das *kfu*-Gencluster auf – zusammen mit den Daten anderer Studien, in denen u. a. der Virulenzgen-Gehalt von ST15-Isolaten bestimmt wurde (Anes et al., 2017; Holt et al., 2015; Zhou et al., 2016), deuten daraufhin, dass *K. pneumoniae*-Isolate des Sequenztyps ST15 häufig in Besitz des *kfu*-Genclusters sind. Auch in Isolaten des Sequenztyps ST101 scheint das *kfu*-Gencluster nicht selten vorzukommen. So war das Gencluster in allen ST101-Isolaten unserer Sammlung nachweisbar und zeigte sich ebenfalls in ST101-Isolaten anderer Studien (Lafeuille et al., 2013; Oteo et al., 2016).

Plasmidgehalt der Carbapenemase-produzierenden Isolate

Der Großteil der in unserer Sammlung nachgewiesenen Plasmidreplikons gehört zu einer der sechs wichtigsten Resistenzplasmidfamilien der Enterobakterien (IncF, IncA/C, IncL/M, IncI, IncHI und IncN) (Carattoli, 2009). Unsere Untersuchungen beschränkten sich auf den Nachweis bekannter Inc-Gruppen in den Ganzgenom-Daten. Da keine kompletten Plasmidsequenzen rekonstruiert wurden, sind an dieser Stelle keine Aussagen darüber möglich, welcher Inc-Gruppe die Carbapenemase-codierenden Plasmide angehörten und ob die Carbapenemase-Gene in allen Fällen auf einem Plasmid vorlagen.

Carbapenmasen des Typs KPC sind typischerweise plasmid-codiert und wurden bereits auf Plasmiden vieler verschiedener Inc-Gruppen beobachtet, darunter: IncFII, IncFIA, IncI2, IncA/C, IncN, IncX, IncR, IncP, IncU, IncW, IncL/M und ColE (Chen et al., 2014b). Plasmide der Gruppe IncFII sind dabei besonders häufig mit dem *bla*_{KPC}-Gen assoziiert (Chen et al., 2014b). IncFII-Replikons fanden sich auch in allen KPC-2- und KPC-3-produzierenden Isolaten unserer Sammlung (siehe 3.3.6). IncFII-Plasmide liegen gewöhnlich in geringen Kopiezahlen und häufig als Multireplikon-Plasmid vor (z.B. in Kombination mit *repFIB*) (Carattoli, 2009). Die in vielen Isolaten unserer Sammlung zusammen nachgewiesenen IncFII- und IncFIB-Replikons sind also möglicherweise Teil eines Multireplikon-Plasmids.

Ähnlich wie die *bla*_{KPC}-Gene kommt auch das *bla*_{NDM-1}-Gen in Plasmiden verschiedener Inc-Gruppen vor (Pitout et al., 2015). So zeigt sich das *bla*_{NDM-1}-Gen in Assoziation mit IncX3- (Ho et al., 2012; Yang et al., 2015), IncFII-, IncN-, IncH-, IncL/M- und IncA/C-Plasmiden (Pitout et al., 2015), wobei

letztere vermutlich verantwortlich für die weite Verbreitung von NDM-1 innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* sind (Pitout et al., 2015). Ein IncA/C-Replikon zeigte sich jedoch in keinem NDM-1-Isolat unserer Sammlung.

Das *bla*_{OXA-48}-Gen verbreitet sich hauptsächlich über ein epidemisches Plasmid (pOXA-48a) vom Typ IncL/M (Pitout et al., 2015). Es wird aber auch über das Vorliegen von *bla*_{OXA-48} auf IncA/C-Plasmiden berichtet (Ktari et al., 2011; Ma et al., 2015). Der Nachweis des IncL/M_(pOXA-48)-Replikons in 88 % der OXA-48-Isolate unserer Sammlung legt nahe, dass diese in Besitz des epidemischen Plasmids waren und dieses Plasmid damit auch innerhalb der deutschen *K. pneumoniae*-Population eine weite Verbreitung zeigt.

Die Ganzgenom-basierte Analyse KPC-2-, KPC-3-, OXA-48- und NDM-1-produzierender *K. pneumoniae*-Isolate ermöglichte eine umfangreiche Charakterisierung der Population zwischen 2008 und 2014 und bietet gleichzeitig eine Grundlage für zukünftige Projekte. So zeigte sich, dass die Population in Deutschland neben international verbreiteten und bekannten Linien auch Sequenztypen umfasst, die bisher selten in Verbindung mit Carbapenemase-Genen beschrieben wurden. Nennenswert ist insbesondere ein OXA-48-produzierendes ST23-Isolat, das eine Vielzahl an Virulenzfaktoren besitzt. Weitere Studien sind notwendig, um beurteilen zu können, wie verbreitet multiresistente, hochvirulente *K. pneumoniae*-Isolate in Deutschland tatsächlich sind und inwieweit diese eine Gefährdung darstellen.

4.4 Analyse CTX-M-15-produzierender *Klebsiella*-Isolate aus einem Ausbruchsgeschehen

Während das Bakterium *K. pneumoniae* bei gesunden Menschen meist nur als Besiedler des Darmtrakts in Erscheinung tritt, kann es bei immunsupprimierten Patienten und Menschen mit Vorerkrankungen ernsthafte Infektionen verursachen (Podschun and Ullmann, 1998). So kommt *K. pneumoniae* eine wichtige Rolle als Erreger nosokomialer Infektionen zu. Mitverantwortlich für den Erfolg als Krankenhauserreger ist dabei die zunehmende Resistenz gegenüber einem Großteil der verfügbaren Antibiotika (Podschun and Ullmann, 1998). Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Ausbruchsgeschehen trat in einer Rehabilitationsklinik auf. Entsprechend handelte es sich bei den betroffenen Patienten um geschwächte Personen mit diversen Vorerkrankungen. Die ab dem Frühjahr 2015 isolierten Patientenisolat wurden zunächst durch das NRZ über die PFGE XbaI-verdauter DNA typisiert. Die anschließend im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Ganzgenom-basierten Analysen konnten die Beobachtung, dass es sich um drei verschiedene Ausbruchskuster handelt, bestätigen. Darüber hinaus konnte die Ganzgenom-Analyse weitere Fragestellungen beantworten und damit einen wertvollen Beitrag zur Aufklärung des Geschehens leisten. Insbesondere die Etablierung der Cluster 1-spezifischen PCR, die Aufklärung der Resistenzursachen und die Identifizierung der Cluster 3-Isolate als Vertreter der Spezies *K. quasipneumoniae* wären ohne den Einsatz der Ganzgenom-Sequenzierung nicht möglich gewesen.

Einordnung der Ausbruchsstämme

Die Isolate des Hauptausbruchskusters konnten dem Sequenztyp ST15 zugeordnet werden. Die Isolate der beiden kleineren Cluster wurden als Vertreter der Sequenztypen ST405 und ST414 identifiziert (siehe 3.4.2).

K. pneumoniae des Sequenztyps ST15

Bei dem Sequenztyp des Hauptausbruchskusters (ST15) handelt es sich um einen sehr erfolgreichen Sequenztyp mit internationaler Verbreitung. So gibt es beispielsweise Berichte über das Auftreten von ST15-Isolaten in Frankreich, Italien, Spanien, Israel (Baraniak et al., 2013; Liapis et al., 2014), Ungarn (Damjanova et al., 2008), Portugal (Rodrigues et al., 2014), Deutschland (Bruchmann et al., 2015), Afrika, Asien und den USA (Breurec et al., 2013; Holt et al., 2015; Lee et al., 2011). Dabei sind Isolate des Sequenztyps ST15 häufig mit EBSL- oder Carbapenemase-Genen assoziiert; auch unter den im Rahmen dieser Arbeit 107 sequenzierten Carbapenemase-produzierenden Isolaten fanden sich vier ST15-Isolate (siehe 3.3.2). Entsprechend sind Berichte von Ausbrüchen mit EBSL- oder Carbapenemase-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolaten dieses Sequenztyps nicht selten (Arana et al., 2015; Sánchez-Romero et al., 2012; Stoesser et al., 2014). Ausbrüche mit ST15-Isolaten, die, wie die in dieser Arbeit beschriebenen Ausbruchisolate, CTX-M-15 produzierten, wurden auch aus den Niederlanden und Portugal berichtet (Novais et al., 2012; Zhou et al., 2016). Neben den Isolaten, die

zum ST15-Ausbruchskuster gehörten, zeigte sich auch ein Einzelisolat desselben Sequenztyps. Dieses ließ sich im Stammbaum gut von den Ausbruchsisolaten abgrenzen (siehe Abbildung 19b). Die Analyse der *wzi*-Gensequenz ergab, dass die Ausbruchsisolate ein anderes *wzi*-Allel aufwiesen als das Einzelisolat. Das Auftreten von zwei Kladen innerhalb des Sequenztyps ST15, von denen eine das *wzi*-Allel *wzi*_93 und die andere das Allel *wzi*_24 trägt, wurde bereits von zwei Arbeitsgruppen beobachtet (Bruchmann et al., 2015; Zhou et al., 2016). Darüber hinaus zeigte sich auch für nicht-europäische Isolate das Auftreten verschiedener Kapseln, hier konnten neben dem Allel *wzi*_93, die Allele *wzi*_9, *wzi*_19 und *wzi*_124 nachgewiesen werden (Holt et al., 2015). Das Vorkommen eines weiteren, bisher nicht bekannten *wzi*-Allels zeigte sich in einem im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Carbapenemase-produzierenden, *K. pneumoniae*-Isolat (siehe 3.3.5). Damit konnten bisher insgesamt sechs verschiedene *wzi*-Allele nachgewiesen werden. Bei dem weltweit erfolgreichen Sequenztyp ST15 handelt es sich demnach um einen Sequenztyp mit einer großen Kapseldiversität, die sich in der parallelen Verbreitung verschiedener ST15-Untergruppen zeigt.

K. pneumoniae des Sequenztyps ST405

Isolate des Sequenztyps ST405 zeigen ebenfalls eine internationale Verbreitung. So gab es in den letzten Jahren Berichte über Carbapenemase-produzierende ST405-Isolate aus europäischen Ländern, wie Spanien, Frankreich, Italien und Belgien, und aus dem Jemen (Del Franco et al., 2015; Gharout-Sait et al., 2014; Glupczynski et al., 2012; de Laveleye et al., 2016; Liapis et al., 2014; Oteo et al., 2013a; Palacios-Baena et al., 2016; Paño-Pardo et al., 2013; Ruiz-Garbajosa et al., 2016). Über das Vorkommen ESBL-produzierender *K. pneumoniae*-Isolate des Sequenztyps ST405 finden sich hingegen kaum Berichte. Zum jetzigen Zeitpunkt liegt lediglich ein Bericht eines CTX-M-15-produzierenden Ausbruchstamms aus Spanien vor (Machuca et al., 2016).

K. quasipneumoniae des Sequenztyps ST414

Berichte über Isolate des Sequenztyps ST414 (Ausbruchskuster 3) finden sich wesentlich seltener als Berichte über das Vorkommen der Sequenztypen der Cluster 1 und 2. So gibt es in der Literatur, abgesehen von den Berichten über ein im Jahr 2007 in Nordamerika isoliertes KPC-2-produzierendes ST414-Isolat (Mataseje et al., 2011) und ein im Jahr 2003 in Taiwan isoliertes CTX-M-14-produzierendes ST414-Isolat (Yan et al., 2015), keine weiteren publizierten Berichte über den Nachweis von ST414-Isolaten. Auch fand sich zur Zeit unserer Analysen keine Publikation, in der die Zugehörigkeit des Sequenztyps ST414 zur Phylogruppe II bzw. zur Spezies *K. quasipneumoniae* beschrieben wird. Zwischenzeitlich ist jedoch eine Studie erschienen, in der ein Isolat des Sequenztyps ST414 identifiziert und der Spezies *K. quasipneumoniae* zugeordnet wurde (Long et al., 2017). Das Auftreten von klinischen, multiresistenten *K. quasipneumoniae*-Isolate ist weit seltener beschrieben als das Vorkommen klinischer, multiresistenter *K. pneumoniae*-Isolate. So konnten trotz umfassender

Literaturrecherche keine Fälle von *K. quasipneumoniae*-Ausbruchsgeschehen oder -Häufungen gefunden werden. In Studien, in denen die Population hinsichtlich des Anteils der verschiedenen Spezies untersucht wurde, machte *K. quasipneumoniae* weniger als 10 % der Isolate aus (Brisse et al., 2004a; Maatallah et al., 2014). Dieses im Vergleich zu *K. pneumoniae sensu stricto* seltener Vorkommen von *K. quasipneumoniae* könnte einer der Gründe dafür sein, warum *K. quasipneumoniae*-Isolate seltener als Ausbruchsstämme in Erscheinung treten. Möglicherweise sind die niedrigen Fallzahlen aber auch auf eine Unterdetektion der tatsächlichen Fallzahlen zurückzuführen. Analysen, die die Identifikation der verschiedenen *Klebsiella*-Spezies ermöglichen, sind meist nicht Teil der klinischen Routinediagnostik, sodass eine Differenzierung über die Zuordnung zur *K. pneumoniae sensu lato*-Population hinaus nicht gegeben ist. Auch in unserem Fall wäre ohne die Ganzgenom-Sequenzierung aller Isolate vermutlich unentdeckt geblieben, dass das Cluster 3 der Spezies *K. quasipneumoniae* angehört. Dass *K. quasipneumoniae*-Isolate aber durchaus von klinischer Relevanz und in der Lage sind, schwere Infektionen hervorzurufen, zeigen die verstärkt in den letzten Jahren publizierten Fallberichte und Veröffentlichungen von Ganzgenom-Sequenzen klinischer *K. quasipneumoniae*-Isolate (Arena et al., 2015; Breurec et al., 2016; Elliott et al., 2016; Garza-Ramos et al., 2016; Ozer et al., 2016). Verantwortlich für die besonders in den vergangenen zwei Jahren auftretenden Berichte könnte die Kombination aus einem vermehrten Bewusstsein und Interesse für die verschiedenen *Klebsiella*-Spezies und dem vermehrten Einsatz der Ganzgenom-Sequenzierung sein, die in ihrer Auflösung klassischen Methoden, wie der biochemischen Charakterisierung und der PFGE, überlegen ist. So wird die zunehmende Verwendung der Ganzgenom-Sequenzierung sicher dazu beitragen, dass in den nächsten Jahren ein umfassenderes Bild der *Klebsiella*-Population entsteht.

Antibiotika-Resistenzen

Die Analyse der Resistenzphänotypen ergab, dass sich zwei der Cluster 1-Isolate in ihrem Resistenzprofil von den restlichen Isolaten unterschieden. Ein Isolat zeigte sich resistent gegenüber Colistin, das andere Isolat war resistent gegenüber Carbapenem-Antibiotika (siehe Tabelle A 4 und Tabelle A 5 im Anhang).

Ursache der Colistin-Resistenz

Die Colistin-Resistenz des Isolats 675/15 konnte auf eine Mutation im *mgrB*-Gen, die ein vorzeitiges Stoppcodon zur Folge hatte, zurückgeführt werden. MgrB ist ein regulatorisches Transmembranprotein, dessen Produktion im Rahmen des PhoQ/PhoP-Signalwegs aktiviert wird. Der PhoQ/PhoP-Signalweg mündet in der Modifikation von Lipid A, die eine Resistenz gegenüber Polymyxinen zur Folge hat. MgrB wirkt über eine negative Feedback-Schleife hemmend auf den Signalweg (Lippa and Goulian, 2009). Bei Deletion oder Inaktivierung des *mgrB*-Gens in *K.*

pneumoniae-Isolaten entfällt dieser negativ-regulatorische Einfluss. Es kommt zu einer Hochregulation des PhoQ/PhoP-Systems und damit zur Colistinresistenz (Cannatelli et al., 2014). Ein vorzeitiges Stoppcodon, das, wie für das Colistin-resistente Isolat aus dem Ausbruchcluster 1, in einem trunkierten MgrB-Protein mit einer Länge von 29 Aminosäuren resultiert, wurde bereits in vier weiteren Colistin-resistenten *K. pneumoniae*-Isolaten beobachtet und als mögliche Ursache für die Resistenz beschrieben (Novović et al., 2017; Olaitan et al., 2014b; Poirel et al., 2015). Ein Colistin-resistentes *K. pneumoniae*-Isolat mit einem trunkierten MgrB (27 Aminosäuren) zeigte sich in Komplementierungsexperimenten nach Bereitstellung des intakten MgrB-Proteins *in trans* empfindlich gegenüber Colistin (Poirel et al., 2015). Diese Beobachtungen zusammen mit der Tatsache, dass keines der anderen Gene, deren Veränderung bzw. Vorhandensein bereits als Ursache für eine Colistin-Resistenz beschrieben wurde, eine Veränderung im Vergleich zu den anderen, nicht Colistin-resistenten Cluster 1-Isolaten zeigte (*pmrA*, *pmrB*, *phoP* und *phoQ*) (Olaitan et al., 2014a) bzw. vorhanden war (*mcr-1* – 5) (Borowiak et al., 2017; Carattoli et al., 2017; Liu et al., 2016; Xavier et al., 2016; Yin et al., 2017)), sprechen dafür, dass das mutierte *mgrB*-Gen tatsächlich die Ursache für die beobachtete Colistin-Resistenz war.

Interessanterweise gab es keinen Hinweis auf eine Colistin-Behandlung des Patienten, die eine Resistenzentwicklung erklären könnte. Dass eine Colistin-Resistenz ohne eine vorherige Gabe von Colistin auftreten kann, wurde für verschiedene Vertreter der *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter cloacae* und *Enterobacter asburiae*) berichtet (Olaitan et al., 2016). Als mögliche Erklärungen für das Auftreten Colistin-resistenter Bakterien ohne vorherige Colistin-Therapie des Patienten werden folgenden Punkte diskutiert: (I) die Aufnahme Colistin-resistenter Bakterien über die Nahrung (Fleisch), (II) die von einer Colistin-Therapie unabhängige Aufnahme von Colistin-Resistenz-vermittelnden Plasmiden und (III) die Kreuz-Resistenz zwischen Colistin und körpereigenen antimikrobiellen Stoffen (Olaitan et al., 2016). Punkt I ist angesichts der Tatsache, dass das Colistin-resistente Isolat Teil eines Ausbruchcluster war und keines der anderen Ausbruchsisolate dieselbe Mutation zeigte, für das hier beschriebene Ausbruchsgeschehen nicht relevant. Punkt II ist für das hier beschriebene Isolat ebenfalls nicht von Relevanz, da der Resistenzmechanismus nicht auf einer plasmid-vermittelten Resistenz beruhte. Hinsichtlich Punkt III konnte gezeigt werden, dass durch Colistin-Therapie resistente *Acinetobacter baumannii*-Isolate auch eine erhöhte Resistenz gegenüber den körpereigenen antimikrobiellen Stoffen LL-37 und Lysozym aufweisen (Napier et al., 2013). Olaitan, Morand und Rolain postulieren daher, dass umgekehrt ein Kontakt mit dem menschlichen Immunsystem eine Colistin-Resistenz hervorrufen könnte (Olaitan et al., 2016). Abgesehen davon, dass dieser Mechanismus bisher weder für *Acinetobacter baumannii*, noch für *K. pneumoniae* experimentell bestätigt wurde, würde man auch in diesem Fall erwarten, dass alle Ausbruchsisolate diesen Phänotyp zeigten – außer wenn die Resistenzentwicklung Patienten-

spezifisch wäre, also vom Immunsystem des jeweiligen Patienten abhängig. Neben den drei genannten Möglichkeiten, wäre beispielsweise auch denkbar, dass ein anderer Patient mit Colistin behandelt wurde, was zur Entstehung eines resistenten Isolats führte, das dann auf diesen Patienten übertragen wurde. Zudem wurde für *E. coli* beobachtet, dass unter Trimethoprim-Exposition gehäuft Mutationen innerhalb des *mgrB*-Gens auftreten können (Baym et al., 2016). Allerdings liegen nicht zu allen in den Ausbruch involvierten Patienten Daten zur Antibiotikatherapie vor und der betroffene Patient erhielt keine Trimethoprim-Therapie. Was für die Entwicklung der Colistin-Resistenz verantwortlich war, lässt sich für diesen Fall daher nicht abschließend beurteilen. Das Auftreten von Colistin-Resistenzen ohne vorherige Colistingabe ist aber in jedem Fall eine Entwicklung, die weiter beobachtet und untersucht werden sollte.

Ursache der Carbapenem-Resistenz

Das Carbapenem-resistente Isolat stammte von einem Patienten, der aufgrund einer Infektion mit einem Cluster 1-Ausbruchsisolat mit Meropenem behandelt wurde. Anders als für das Colistin-resistente Isolat lässt sich damit ein Zusammenhang zwischen Therapie und Resistenzentwicklung herstellen. Ein Carbapenemase-Gen konnte in dem betroffenen Isolat nicht nachgewiesen werden, dafür zeigten sich Veränderungen der beiden Porin-Gene *ompK35* (Insertion einer Transposase) und *ompK36* (Deletion und in der Folge ein vorzeitiges Stoppcodon). Über das Auftreten eines Porinverlusts in Folge einer Behandlung mit Meropenem wurde auch im Rahmen einer Analyse eines *K. pneumoniae*-Ausbruchs in Spanien berichtet. Hier zeigte sich nach einer 13-tägigen Therapie eine Punktmutation im *ompK36*-Gen, die ebenfalls ein vorzeitiges Stoppcodon zur Folge hatte (Lopez-Camacho et al., 2014). In unserem Fall erhielt der Patient eine achttägige Meropenem-Therapie. Das Carbapenem-resistente Isolat wurde aber ebenfalls an Tag 13 nach Therapiebeginn detektiert. Kein anderes sequenziertes Isolat zeigte Veränderungen in beiden *ompK*-Genen. Dass die drei Isolate, die jeweils ein mutiertes Gen aufwiesen, keine ausgeprägte Resistenz gegenüber Carbapenemen aufwiesen, stimmt mit der Annahme überein, dass für eine erhöhte Resistenz der Verlust beider Porine notwendig ist (Martínez-Martínez, 2008).

Bewertung eines möglichen Zusammenhangs der drei Ausbruchcluster

Angeichts des Vorkommens des *bla*_{CTX-M-15}-Gens in den Isolaten aller drei Ausbruchcluster, stellte sich die Frage, ob zwischen den Isolaten der verschiedenen Cluster eine Verbindung über einen horizontalen Plasmidtransfer bestand. Für die Isolate des Clusters 1 konnte jedoch nicht geklärt werden, ob das *bla*_{CTX-M-15}-Gen auf einem Plasmid vorlag, chromosomal kodiert war oder ob – auch dieser Fall wurde bereits für *K. pneumoniae* beschrieben – das Gen gleichzeitig sowohl im Chromosom, als auch auf einem Plasmid vorlag (Hudson et al., 2014; Zhou et al., 2015). Im Falle einer Mobilisierung des *bla*_{CTX-M-15}-Gens während des Ausbruchs wären auch Unterschiede in der

Lokalisation zwischen den Isolaten denkbar. Zwar gab es sowohl Hinweise auf ein chromosomales Vorkommen, als auch auf ein Vorkommen des Gens auf einem Plasmid, für einen Großteil der Isolate waren aber die assemblierten *Contigs* nicht groß genug, um sie eindeutig zuordnen zu können. Zu kurze *Contigs* waren auch der Grund, weshalb für die Isolate der Cluster 2 und 3 keine Informationen zur Lokalisation des *bla*_{CTX-M-15}-Gens abgeleitet werden konnten. Insbesondere repetitive Bereiche innerhalb eines zu assemblierenden Genoms stellen eine Herausforderung für das *de novo-Assembly* von kurzen *Reads*, wie z.B. Illumina Miseq-*Reads*, dar (Treangen and Salzberg, 2011). Wiederholt vorkommende Bereiche, wie z.B. mobile genetische Elemente, die größer sind als die zu assemblierenden *Reads* führen zu Lücken im *Assembly*, also zu kleineren *Contigs*. Auch der Versuch, die Lokalisation des *bla*_{CTX-M-15}-Gens über eine PCR-Amplifikation der Bereiche der *Contigs*, deren Sequenz für ein chromosomal bzw. plasmid-codiertes *bla*_{CTX-M-15}-Gen sprach, aufzuklären, war nicht erfolgreich. Gründe dafür, dass keine Etablierung stabiler PCR-Protokolle möglich war, sind vermutlich einerseits die großen zu amplifizierenden Bereiche (bis zu 3 kb) und andererseits das mögliche mehrfache Auftreten des *bla*_{CTX-M-15}-Gens, in dem jeweils der *Reverse-Primer* lag.

In Studien, bei denen ein horizontaler Plasmidtransfer, auch über Speziesgrenzen hinweg, nachgewiesen wurde, kamen folgende Kriterien zur Anwendung: (I) der Nachweis eines Plasmid gleicher Größe, (II) der Nachweis einer identischen genetischen Umgebung des jeweiligen Resistenzgens (III) der Nachweis eines Plasmid vom selben Inc-Typ und (IV) der Nachweis einer identischen Plasmidsequenz (nicht alle Kriterien wurden in allen Studien berücksichtigt) (Borgia et al., 2012; Göttig et al., 2015; Mathers et al., 2011; Robert Koch-Institut, 2014; Yao et al., 2014).

Die exemplarische Analyse von drei Cluster 1-Isolaten zeigte, dass bereits innerhalb des Clusters 1 kein gemeinsames, in der Größe identisches Plasmid (>20 kb) vorlag. Die Untersuchung der genetischen Umgebung des *bla*_{CTX-M-15}-Gens ergab, dass die Isolate der Cluster 1 und 3 *upstream* des *bla*_{CTX-M-15}-Gens dasselbe Transposase-Gen (*ISEcp1*) besaßen, wohingegen die Isolate des Clusters 2 ein anderes Transposase-Gen (*IS15DIV*) aufwiesen. Eine Verbindung der Cluster 1 und 2 bzw. 2 und 3 über ein gemeinsames *bla*_{CTX-M-15}-tragendes Plasmid erscheint damit unwahrscheinlich.

Gegen das Vorhandensein eines gemeinsamen Plasmids in den Isolaten der Cluster 1 und 3 sprach, dass kein gemeinsames Plasmidreplikon nachgewiesen werden konnte. Das *bla*_{CTX-M-15}-Gen der Cluster 1-Isolate lag wahrscheinlich auf einem IncR-Plasmid. Dafür spricht zumindest das für ein Cluster 1-Isolat beobachtete Vorkommen des *bla*_{CTX-M-15}-Gens auf einem *Contig* mit dem entsprechenden *rep*-Gen. Dieses Gen konnte in der Mehrheit der Cluster 1-Isolate nachgewiesen werden, zeigte sich aber in keinem der Cluster 3-Isolate.

Im vorliegenden Ausbruchsgeschehen zeigten sich somit keine Hinweise auf das Vorliegen eines gemeinsamen Plasmids in zwei bzw. allen drei Ausbruchsklustern. Angesichts der weiten Verbreitung

von CTX-M-15 innerhalb der *K. pneumoniae*-Population (Calbo and Garau, 2015), ist das parallele und voneinander unabhängige Vorkommen von drei CTX-M-15-produzierenden *K. pneumoniae*-Stämmen jedoch kein ungewöhnliches Ereignis.

Die durchgeführten Analysen beruhten hauptsächlich auf der Auswertung der Miseq-Daten und lieferten nur unzureichende Ergebnisse zur Lokalisation des *bla*_{CTX-M-15}-Gens. Um die Frage nach der Lokalisation abschließend zu beantworten, bieten sich die folgenden Strategien an. So könnte eine PFGE mit S1-Nuklease-Verdau und anschließendem Southern Blot sowie einem Nachweis des *bla*_{CTX-M-15}-Gens über eine Sonde die Lokalisation des *bla*_{CTX-M-15}-Gens auf einem Plasmid nachweisen. Ebenso könnten Konjugations- und Transformationsexperimente Aufschluss darüber geben, ob das *bla*_{CTX-M-15}-Gen plasmid-codiert vorliegt. Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis einer Lokalisation auf einem Plasmid wäre die Extraktion der Plasmid-DNA, gefolgt von einem Verdau mit einer DNase, die die Reste der chromosomalen DNA verdaut (z.B. Plasmid-Safe DNase), und eine anschließende PCR zum Nachweis des *bla*_{CTX-M-15}-Gens. Um jedoch das gleichzeitige Vorkommen zweier Kopien nachzuweisen, wäre eine PacBio-Sequenzierung, die eine möglichst vollständige Rekonstruktion des Genoms, also des Chromosoms und aller enthaltenen Plasmide ermöglicht, die Methode der Wahl.

Entwicklung der Cluster 1-spezifischen Multiplex-PCR

Zur schnellen Identifizierung von Ausbruchsisolaten des Clusters 1 wurde eine Cluster-spezifische PCR etabliert. Diese basierte auf der Amplifikation von drei in ihrer Kombination für den Ausbruchstamm spezifischen Regionen. Die Multiplex-PCR war in der Lage zwischen Cluster 1- und Nicht-Cluster1-Isolaten aus der Rehabilitationsklinik zu unterscheiden (siehe 3.4.3, Abbildung 20). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich epidemiologisch nicht verwandte Isolate aus verschiedenen Krankenhäusern in Deutschland, darunter drei vom Sequenztyp ST15, aufgrund des PCR-Ergebnisses von den Ausbruchsisolaten abgrenzen ließen.

Die Ableitung stammspezifischer Regionen aus Ganzgenom-Daten und davon ausgehend die Entwicklung einer spezifischen PCR war auch Teil einer Publikation, die während der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Ausbruchsanalyse, veröffentlicht wurde (Zhou et al., 2016). Der in der niederländischen Studie analysierte Ausbruch wurde ebenfalls von einem CTX-M-15-produzierenden *K. pneumoniae*-Stamm des Sequenztyps ST15 verursacht. Die Vorgehensweise zur Auswahl der stammspezifischen Regionen war jedoch eine andere als die von uns gewählte. Die Autoren der niederländischen Studie ermittelten zunächst das Kerngenom der Ausbruchsisolate. Alle Regionen des Kerngenoms, die in der BLAST-Suche gegen eine lokale Datenbank aus 76 *K. pneumoniae*-Genomen verschiedener Sequenztypen keine Treffer zeigten, wurden anschließend mit der Genbank-Datenbank abgeglichen. Regionen, die wiederum keine Treffer zeigten und deren Sequenz weder verwandt mit Phagen-, Plasmid- und Transposon-Sequenzen war, wurden als ausbruchspezifische Regionen

angesehen (Zhou et al., 2016). Im Gegensatz dazu stützte sich unsere PCR auf drei Regionen, die jeweils unter Verwendung verschiedener Strategien ausgewählt wurden. Da die erste Region spezifisch für Isolate des Sequenztyps ST15 sein sollte, wurde hier ein Bereich ausgewählt, der nur in den Cluster 1-Isolaten und im ebenfalls zu ST15-gehörenden Referenzgenom vorkam, d.h. eine Region des Kerngenoms, also des gemeinsamen Genoms der eingeschlossenen ST15-Isolate ohne BLAST-Treffer in *K. pneumoniae*-Isolaten anderer Sequenztypen. Die zweite Region unserer PCR entsprach einer Region Kerngenoms der Cluster 1-Isolate ohne BLAST-Treffer in anderen *K. pneumoniae*-Isolaten und Plasmidsequenzen. Der Hauptunterschied liegt sicherlich in dem bewussten Ausschließen von mobilen genetischen Elementen als Zielregionen für die PCR durch die niederländische Arbeitsgruppe, während in unserer PCR das dritte Primerpaar eine Region innerhalb eines Plasmids amplifizierte. Allerdings wurde bei der Auswertung unserer PCR der Möglichkeit struktureller Veränderungen oder sogar dem Verlust dieses Plasmids insofern Rechnung getragen, als dass Isolate, die die beiden anderen PCR-Produkte aufweisen trotz des Nichtvorhandenseins des dritten PCR-Produkts dem Cluster 1 zugeordnet wurden.

Das Primerpaar hem-F/-R unserer Cluster 1-spezifischen PCR sollte möglichst spezifisch für Isolate des Sequenztyps ST15 sein. Alle untersuchten ST15-Isolate, d.h. die Isolate des Clusters 1, das Einzelisolat vom Sequenztyp ST15, die drei ST15-Isolate unter den epidemiologisch nicht verwandten *K. pneumoniae*-Isolaten, das als Referenz verwendete *K. pneumoniae*-Genom und die zwei weiteren ST15-Isolate, die in der Zwischenzeit in der NCBI-Datenbank hinterlegt wurden (*K. pneumoniae* KP36, NZ_CP017385.1 und *K. pneumoniae* Kp_Goe_39795, NZ_CP018458.1), wiesen die entsprechenden Genomsequenz auf. Jedoch zeigte sich auch für das zum Sequenztyp ST2382 gehörende Klinikisolat ein PCR-Produkt. Bei dem Primerpaar hem-F/-R handelt sich daher nicht um ein ST15-spezifisches Primerpaar. Die vermeintlich ST15-spezifischen Regionen wurden über BLAST-Suchen gegen die Einträge der *nucleotide collection* auf ihr Vorkommen in anderen *K. pneumoniae*-Isolaten untersucht. Auch wenn die *nucleotide collection* einen großen Datensatz (Sequenzeinträge von Genbank, EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Databank of Japan), PDB (Protein Data Bank) und RefSeq) umfasst, decken die hinterlegten Genomsequenzen nur einen Bruchteil der realen Bakterienpopulation ab. So besteht letztlich auch für Regionen, die in keiner der hinterlegten Sequenzen vorkommen, die Möglichkeit des Vorhandenseins dieser Region in bisher nicht sequenzierten Isolaten.

Der Einsatz der Ganzgenom-Sequenzierung zur Untersuchung des Ausbruchsgeschehens ermöglichte eine umfassende Charakterisierung der Ausbruchs isolate und die Identifizierung von insgesamt drei unabhängigen Ausbruchsklustern. Die Frage nach der Lokalisation des *bla*_{CTX-M-15}-Gens konnte nicht abschließend geklärt werden. Jedoch sprechen die Ergebnisse der Untersuchung der genetischen Umgebung des *bla*_{CTX-M-15}-Gens und der Untersuchung des Plasmidgehalts nicht für Verbindung der

Cluster über ein gemeinsames Plasmid. Basierend auf den Ganzgenom-Daten konnten die genetischen Ursachen für die Carbapenem-Resistenz bzw. Colistinresistenz zweier Isolate aufgeklärt werden. Außerdem konnten die Ganzgenom-Daten erfolgreich genutzt werden, um eine für den Hauptausbruchsstamm spezifische PCR abzuleiten. Auch wenn die hier vorgestellte PCR nicht in der Klinikroutine zum Einsatz kam, konnte gezeigt werden, dass die Ableitung einer spezifischen PCR aus Ganzgenom-Daten möglich ist und die entwickelte PCR eine einfache und im Vergleich zur Ganzgenom-Sequenzierung zeitsparende Möglichkeit bietet, Isolate des Clusters 1 zu identifizieren. Die in dieser Arbeit entwickelten Strategien zur Identifizierung stammspezifischer Regionen können als Grundlage für zukünftige Ausbruchsanalysen dienen. In Zukunft empfiehlt es sich jedoch – wie in der Studie von Zhou et al. 2016 – Plasmidsequenzen und mobile genetische Elemente auszuschließen.

5 Literatur

- Adler, A., Hussein, O., Ben-David, D., Masarwa, S., Navon-Venezia, S., Schwaber, M.J., Carmeli, Y., Setton, E., Golan, S., Brill, S., et al. (2015). Persistence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 as the predominant clone of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in post-acute-care hospitals in Israel, 2008-13. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 89–92.
- Aggoune, N., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Benamrouche, N., Naim, M., and Rahal, K. (2014). Emergence of plasmid mediated carbapenemase OXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* strain in Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2, 327–329.
- Ahn, C., Yoon, S.S., Yong, T.S., Jeong, S.H., and Lee, K. (2016a). The resistance mechanism and clonal distribution of tigecycline-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* isolates in Korea. *Yonsei Med. J.* 57, 641–646.
- Ahn, S., Sung, J.Y., Kim, H., Kim, M.S., Hwang, Y., Jong, S., Seo, Y., Ha, E., Park, E.S., Choi, J.Y., et al. (2016b). Molecular Epidemiology and Characterization of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Isolated at a University Hospital in Korea during 4-Year Period. *Ann. Clin. Microbiol.* 19, 39.
- Aires, C.A.M., Rocha-de-Souza, C.M., Timm, L.N., Pereira, P.S., Carvalho-Assef, A.P.D.A., and Asensi, M.D. (2016). Early detection of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* ST17 co-harboring blaCTX-M-8 in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 86, 434–436.
- Al-Tawfiq, J.A., Laxminarayan, R., and Mendelson, M. (2016). How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin-resistance in humans and animals? *Int. J. Infect. Dis.* 54, 77–84.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Anes, J., Hurley, D., Martins, M., and Fanning, S. (2017). Exploring the Genome and Phenotype of Multi-Drug Resistant *Klebsiella pneumoniae* of Clinical Origin. *Front. Microbiol.* 8, 1913.
- Arana, D.M., Saez, D., García-Hierro, P., Bautista, V., Fernández-Romero, S., Ángel de la Cal, M., Alós, J.I., and Oteo, J. (2015). Concurrent interspecies and clonal dissemination of OXA-48 carbapenemase. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 148.e1-148.e4.
- Arena, F., De Angelis, L.H., Pieralli, F., Pilato, V. Di, Giani, T., Torricelli, F., Maria D 'andrea, M., and Rossolini, G.M. (2015). Draft Genome Sequence of the First Hypermucoviscous *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* Isolate from a Bloodstream Infection. *Genome Announc.* 3, 952–15.
- Arndt, D., Grant, J.R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., and Wishart, D.S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 44, 1–6.
- Bado, I., Gutierrez, C., Garcia-Fulgueiras, V., Cordeiro, N.F., Pirez, L., Seija, V., Bazet, C., Rieppi, G., and Vignoli, R. (2016). CTX-M-15 in combination with aac(6')-Ib-cr is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including K-pneumoniae ST258, in an ICU in Uruguay. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 6, 5–9.
- Balm, M.N.D., Ngan, G., Jureen, R., Lin, R.T.P., and Teo, J.W.P. (2013). OXA-181-producing *Klebsiella pneumoniae* establishing in Singapore. *BMC Infect. Dis.* 13, 58.
- Baraniak, A., Grabowska, A., Izdebski, R., Fiett, J., Herda, M., Bojarska, K., Zabicka, D., Kania-Pudło, M., Młynarczyk, G., Zak-Puławska, Z., et al. (2011). Molecular characteristics of KPC-producing Enterobacteriaceae at the early stage of their dissemination in Poland, 2008-2009.

Antimicrob. Agents Chemother. 55, 5493–5499.

Baraniak, A., Izdebski, R., Fiett, J., Sadowy, E., Adler, A., Kazma, M., Salomon, J., Lawrence, C., Rossini, A., Salvia, A., et al. (2013). Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1992–1997.

Barton, B.M., Harding, G.P., and Zuccarelli, A.J. (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* 226, 235–240.

Bathoorn, E., Rossen, J.W., Lokate, M., Friedrich, A.W., and Hammerum, A.M. (2015). Isolation of an NDM-5-producing ST16 *Klebsiella pneumoniae* from a Dutch patient without travel history abroad, August 2015. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* 20, 16–18.

Bathoorn, E., Tsioutis, C., da Silva Voorham, J.M., Scoulica, E. V., Ioannidou, E., Zhou, K., Rossen, J.W., Gikas, A., Friedrich, A.W., and Grundmann, H. (2016). Emergence of pan-resistance in KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Crete, Greece: A close call. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 1207–1212.

Baym, M., Lieberman, T.D., Kelsic, E.D., Chait, R., Gross, R., Yelin, I., and Kishony, R. (2016). Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science* (80-.). 353, 1147–1151.

Becker, L., Bunk, B., Eller, C., Steglich, M., Pfeifer, Y., Werner, G., and Nübel, U. (2015). Complete genome sequence of a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak strain from multilocus sequence type 514. *Genome Announc.* 3, e00742-15.

Becker, L., Steglich, M., Fuchs, S., Werner, G., and Nübel, U. (2016). Comparison of six commercial kits to extract bacterial chromosome and plasmid DNA for MiSeq sequencing. *Sci. Rep.* 6, 28063.

Bedenić, B., Mazzariol, A., Plečko, V., Bošnjak, Z., Barl, P., Vraneš, J., and Cornaglia, G. (2012). First report of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *J. Chemother.* 24, 237–239.

Berensmeier, S. (2006). Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 495–504.

Bialek-Davenet, S., Criscuolo, A., Ailloud, F., Passet, V., Jones, L., Delannoy-Vieillard, A.S., Garin, B., Hello, S. Le, Arlet, G., Nicolas-Chanoine, M.H., et al. (2014a). Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1812–1820.

Bialek-Davenet, S., Criscuolo, A., Ailloud, F., Passet, V., Nicolas-Chanoine, M.H., Decré, D., and Brisse, S. (2014b). Development of a multiplex PCR assay for identification of *klebsiella pneumoniae* hypervirulent clones of capsular serotype K2. *J. Med. Microbiol.* 63, 1608–1614.

Bojer, M.S., Hammerum, A.M., Jørgensen, S.L., Hansen, F., Olsen, S.S., Krogfelt, K.A., and Struve, C. (2012). Concurrent emergence of multidrug resistance and heat resistance by CTX-M-15-encoding conjugative plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Apmis* 120, 699–705.

Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.

Bonura, C., Giuffrè, M., Aleo, A., Fasciana, T., Di Bernardo, F., Stampone, T., Giammanco, A., Palma, D.M., Mammina, C., Geraci, D.M., et al. (2015). An update of the evolving epidemic of blaKPC carrying *Klebsiella pneumoniae* in Sicily, Italy, 2014: Emergence of multiple Non-ST258 Clones. *PLoS One* 10, 1–9.

Borgia, S., Lastovetska, O., Richardson, D., Eshaghi, A., Xiong, J., Chung, C., Baqi, M., McGeer, A.,

Ricci, G., Sawicki, R., et al. (2012). Outbreak of carbapenem-resistant enterobacteriaceae containing blaNDM-1, Ontario, Canada. *Clin. Infect. Dis.* 55, e109-17.

Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J.A., Hendriksen, R.S., Szabo, I., and Malorny, B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J. Antimicrob. Chemother.*

Bowers, J.R., Kitchel, B., Driebe, E.M., MacCannell, D.R., Roe, C., Lemmer, D., De Man, T., Rasheed, J.K., Engelthaler, D.M., Keim, P., et al. (2015). Genomic analysis of the emergence and rapid global dissemination of the clonal group 258 *Klebsiella pneumoniae* pandemic. *PLoS One* 10.

Bradford, P.A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 933–51, table.

Breurec, S., Guessennd, N., Timinouni, M., Le, T.A.H., Cao, V., Ngandjio, A., Randrianirina, F., Thiberge, J.M., Kinana, A., Dufougeray, A., et al. (2013). *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: Multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 349–355.

Breurec, S., Melot, B., Hoen, B., Passet, V., Schepers, K., Bastian, S., and Brisse, S. (2016). Liver abscess caused by infection with community-acquired *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 529–531.

Brisse, S., and Verhoef, J. (2001). Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 915–924.

Brisse, S., van Himbergen, T., Kusters, K., and Verhoef, J. (2004a). Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 942–945.

Brisse, S., Issenhuth-Jeanjean, S., and Grimont, P.A.D. (2004b). Molecular serotyping of *Klebsiella* species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3388–3398.

Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., and Grimont, P. (2009). Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One* 4.

Brisse, S., Passet, V., Haugaard, A.B., Babosan, A., Kassis-Chikhani, N., Struve, C., and Decré, D. (2013). *wzi* Gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *J. Clin. Microbiol.* 51, 4073–4078.

Brisse, S., Passet, V., and Grimont, P.A.D. (2014). Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 3146–3152.

Bronner, I.F., Quail, M.A., Turner, D.J., and Swerdlow, H. (2014). Improved protocols for Illumina sequencing. *Curr. Protoc. Hum. Genet.*

Bruchmann, S., Muthukumarasamy, U., Pohl, S., Preusse, M., Bielecka, A., Nicolai, T., Hamann, I., Hillert, R., Kola, A., Gastmeier, P., et al. (2015). Deep transcriptome profiling of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates reveals strain and sequence type-specific adaptation. *Environ. Microbiol.* 17,

4690–4710.

Budelier, K., and Schorr, J. (2001). Purification of DNA by anion-exchange chromatography. *Curr. Protoc. Mol. Biol. Chapter 2*, Unit 2.1B.

Bush, K., and Jacoby, G.A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 969–976.

Calbo, E., and Garau, J. (2015). The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. *Futur. Microbiol* 10, 1063–1075.

Calia, C., Pazzani, C., Oliva, M., Scrascia, M., Lovreglio, P., Capolongo, C., Dionisi, A.M., Chiarelli, A., and Monno, R. (2017). Carbapenemases-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitals of two regions of Southern Italy. *APMIS* 125, 491–498.

Cannatelli, A., Giani, T., D’Andrea, M.M. aria, Di Pilato, V., Arena, F., Conte, V., Tryfinopoulou, K., Vatopoulos, A., and Rossolini, G.M. (2014). MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5696–5703.

Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2227–2238.

Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., and Threlfall, E.J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63, 219–228.

Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M.V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F.M., and Hasman, H. (2014). In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3895–3903.

Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzotti, G., and Magistrali, C.F. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance* 22, 30589.

Castanheira, M., Farrell, S.E., Wanger, A., Rolston, K. V, Jones, R.N., and Mendes, R.E. (2013). Rapid expansion of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in two Texas hospitals due to clonal spread of ST258 and ST307 lineages. *Microb. Drug Resist.* 19, 295–297.

Cejas, D., Canigia, L.F., Cruz, G.R., Elena, A.X., Maldonado, I., Gutkind, G.O., and Radice, M.A. (2014). First isolate of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 from the Americas. *J. Clin. Microbiol.* 52, 3483–3485.

Cerqueira, G.C., Earl, A.M., Ernst, C.M., Grad, Y.H., Dekker, J.P., Huang, S.S., Kirby, J.E., Onderdonk, A.B., Birren, B.W., Hung, D.T., et al. (2016). Multi-institute analysis of carbapenem resistance reveals remarkable diversity, unexplained mechanisms, and limited clonal outbreaks.

Chand, M.S., and MacArthur, C.J. (1997). Primary Atrophic Rhinitis: A Summary of Four Cases and Review of the Literature. *Otolaryngol. Neck Surg.* 116, 554–558.

Chen, L., Mathema, B., Pitout, J.D.D., DeLeo, F.R., and Kreiswirth, B.N. (2014a). Epidemic *Klebsiella pneumoniae* ST258 is a hybrid strain. *MBio* 5.

Chen, L., Mathema, B., Chavda, K.D., DeLeo, F.R., Bonomo, R.A., and Kreiswirth, B.N. (2014b). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol.* 22, 686–696.

Chen, L., Chavda, K.D., Findlay, J., Peirano, G., Hopkins, K., Pitout, J.D.D., Bonomo, R.A.,

- Woodford, N., DeLeo, F.R., and Kreiswirth, B.N. (2014c). Multiplex PCR for identification of two capsular types in epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4196–4199.
- Chen, L., Chavda, K.D., Deleo, F.R., Bryant, K. a, Jacobs, M.R., Bonomo, R. a, and Kreiswirth, B.N. (2015). Genome Sequence of a *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 Isolate with Prophage-Encoded K . *pneumoniae* Carbapenemase. *Genome Announc* 3, 1–2.
- Cheng, L., Cao, X.-L., Zhang, Z.-F., Ning, M., Xu, X.-J., Zhou, W., Chen, J.-H., Zhang, J., Shen, H., and Zhang, K. (2016a). Clonal dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone with high prevalence of *oqxAB* and *rmtB* in a tertiary hospital in China: results from a 3-year period. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 15, 1.
- Cheng, Y.H., Lin, T.L., Lin, Y.T., and Wang, J.T. (2016b). Amino acid substitutions of *crfb* responsible for resistance to colistin through *crbc* in *klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 3709–3716.
- Chin, C.-S., Alexander, D.H., Marks, P., Klammer, A.A., Drake, J., Heiner, C., Clum, A., Copeland, A., Huddleston, J., Eichler, E.E., et al. (2013). Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat. Methods* 10, 563–569.
- Clancy, C.J., Chen, L., Shields, R.K., Zhao, Y., Cheng, S., Chavda, K.D., Hao, B., Hong, J.H., Doi, Y., Kwak, E.J., et al. (2013). Epidemiology and molecular characterization of bacteremia due to carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* in transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 13, 2619–2633.
- Coil, D., Jospin, G., and Darling, A.E. (2015). A5-miseq: An updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics* 31, 587–589.
- Compain, F., Decre, D., Fulgencio, J.P., Berraho, S., Arlet, G., and Verdet, C. (2014). Molecular characterization of DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates collected during a 4-year period in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 80, 159–161.
- Conlan, S., Deming, C., Tsai, Y., Lau, A.F., Dekker, J.P., Korlach, J., and Segre, J.A. (2014a). Complete Genome Sequence of a *Klebsiella pneumoniae* Isolate with Chromosomally Encoded Carbapenem Resistance and Colibactin Synthesis Loci. *Genome Announc.* 2, 1–2.
- Conlan, S., Thomas, P.J., Deming, C., Park, M., Lau, A.F., Dekker, J.P., Snitkin, E.S., Clark, T.A., Luong, K., Song, Y., et al. (2014b). Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Sci. Transl. Med.* 6, 254ra126-254ra126.
- Conte, V., Monaco, M., Giani, T., D’Ancona, F., Moro, M.L., Arena, F., D’Andrea, M.M., Rossolini, G.M., Pantosti, A., Bianchi, E., et al. (2016). Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from invasive infections in Italy: Increasing diversity with predominance of the ST512 clade II sublineage. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 1–6.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L., and Maas, W.K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* 52, 375–395.
- Cubero, M., Cuervo, G., Dominguez, M.Á.Á., Tubau, F., Martí, S., Sevillano, E., Gallego, L., Ayats, J., Peña, C., Pujol, M., et al. (2015). Carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible isogenic isolates of *Klebsiella pneumoniae* ST101 causing infection in a tertiary hospital. *BMC Microbiol.* 15, 177.
- Cullik, A., Pfeifer, Y., Prager, R., Von Baum, H., and Witte, W. (2010). A novel IS26 structure surrounds *blaCTX-M* genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates. *J. Med. Microbiol.* 59, 580–587.

- Cuzon, G., Ouanich, J., Gondret, R., Naas, T., and Nordmann, P. (2011). Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2420–2423.
- D’Andrea, M.M., Amisano, F., Giani, T., Conte, V., Ciacci, N., Ambretti, S., Santoriello, L., and Rossolini, G.M. (2014). Diversity of capsular polysaccharide gene clusters in Kpc-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates of sequence type 258 involved in the Italian epidemic. *PLoS One* 9.
- D’Andrea, M.M., Marmo, P., Henrici De Angelis, L., Palmieri, M., Ciacci, N., Di Lallo, G., Demattè, E., Vannuccini, E., Lupetti, P., Rossolini, G.M., et al. (2017). ϕ bO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage. *Sci. Rep.* 7.
- Damjanova, I., Tóth, Á., Pászti, J., Hajbel-Vékony, G., Jakab, M., Berta, J., Milch, H., and Füzi, M. (2008). Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005 - The new “MRSAs”? *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 978–985.
- DeLeo, F.R., Chen, L., Porcella, S.F., Martens, C.A., Kobayashi, S.D., Porter, A.R., Chavda, K.D., Jacobs, M.R., Mathema, B., Olsen, R.J., et al. (2014). Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 4988–4993.
- Di, D.Y.W., Jang, J., Unno, T., and Hur, H.-G. (2017). Emergence of *Klebsiella variicola* positive for NDM-9, a variant of New Delhi metallo- β -lactamase, in an urban river in South Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* dkw547.
- Diago-Navarro, E., Chen, L., Passet, V., Burack, S., Ulacia-Hernando, A., Kodiyanplakkal, R.P., Levi, M.H., Brisse, S., Kreiswirth, B.N., and Fries, B.C. (2014). Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibit variability in capsular polysaccharide and capsule associated virulence traits. *J. Infect. Dis.* 210, 803–813.
- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P.A.D., and Brisse, S. (2005). Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4178–4182.
- Didelot, X., Bowden, R., Wilson, D.J., Peto, T.E.A., and Crook, D.W. (2012). Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 13, 601–612.
- Diestra, K., Miró, E., Martí, C., Navarro, D., Cuquet, J., Coll, P., and Navarro, F. (2011). Multiclonal epidemic of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing DHA-1 in a Spanish hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1032–1036.
- Doi, Y., Hazen, T.H., Boitano, M., Tsai, Y.C., Clark, T.A., Korlach, J., and Rasko, D.A. (2014). Whole-genome assembly of *Klebsiella pneumoniae* coproducing NDM-1 and OXA-232 carbapenemases using single-molecule, real-time sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5947–5953.
- Van Duin, D., Perez, F., Rudin, S.D., Cober, E., Hanrahan, J., Ziegler, J., Webber, R., Fox, J., Mason, P., Richter, S.S., et al. (2014). Surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Tracking molecular epidemiology and outcomes through a regional network. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4035–4041.
- Ekblom, R., and Wolf, J.B.W. (2014). A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evol. Appl.* 7, 1026–1042.

- Ellem, J.A., Ginn, A.N., Chen, S.C.-A., Ferguson, J., Partridge, S.R., and Iredell, J.R. (2017). Locally Acquired *mcr-1* in *Escherichia coli*, Australia, 2011 and 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 1160–1163.
- Eller, C. (2014). Molekulare Untersuchungen zu Extended- Spektrum β -Laktamase (ESBL) - bildenden Enterobacteriaceae als Besiedler und Infektionserreger des Menschen.
- Elliott, A.G., Ganesamoorthy, D., Coin, L., Cooper, M.A., and Cao, M.D. (2016). Complete Genome Sequence of *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* Strain ATCC 700603. *Genome Announc.* 4, e00438-16.
- Empel, J., Baraniak, A., Literacka, E., Mrówka, A., Fiett, J., Sadowy, E., Hryniewicz, W., Gniadkowski, M., Bakiera, J., Budak, A., et al. (2008). Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in Enterobacteriaceae isolates from Polish Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2449–2454.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2017). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) (Stockholm).
- Fevre, C., Passet, V., Deletoile, A., Barbe, V., Frangeul, L., Almeida, A.S., Sansonetti, P., Tournebize, R., and Brisse, S. (2011). PCR-based identification of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*, the agent of rhinoscleroma. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5.
- Fonseca, E.L., Ramos, N. da V., Andrade, B.G.N., Morais, L.L.C.S., Marin, M.F.A., and Vicente, A.C.P. (2017). A one-step multiplex PCR to identify *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae* in the clinical routine. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 87, 315–317.
- Del Franco, M., Paone, L., Novati, R., Giacomazzi, C.G., Bagattini, M., Galotto, C., Montanera, P.G., Triassi, M., and Zarrilli, R. (2015). Molecular epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in Valle d'Aosta region, Italy, shows the emergence of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 101 (ST101 and ST1789). *BMC Microbiol.* 15, 260.
- Freeman, J.T., Rubin, J., McAuliffe, G.N., Peirano, G., Roberts, S. a, Drinković, D., and Pitout, J.D. (2014). Differences in risk-factor profiles between patients with ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicentre case-case comparison study. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 3, 27.
- Gaiarsa, S., Comandatore, F., Gaibani, P., Corbella, M., Valle, C.D., Epis, S., Scaltriti, E., Carretto, E., Farina, C., Labonia, M., et al. (2015). Genomic epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* in Italy and novel insights into the origin and global evolution of its resistance to carbapenem antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 389–396.
- Galetti, R., Andrade, N., Chandler, M., Varani, D.M., and Costa, L. (2016). New Small Plasmid Harboring bla KPC-2 in *Pseudomonas aeruginosa*. 60, 3211–3214.
- Gamal, D., Fernández-Martínez, M., Salem, D., El-Defrawy, I., Montes, L.Á., Ocampo-Sosa, A.A., and Martínez-Martínez, L. (2016). Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Egypt containing blaNDM-1 on IncR plasmids and its association with rmtF. *Int. J. Infect. Dis.* 43, 17–20.
- Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., Catalán-Nájera, J., Barrios, H., Rodríguez-Medina, N., Garza-González, E., Cevallos, M.A., and Lozano, L. (2016). Draft Genome Sequence of a Hypermucoviscous Extended-Spectrum- beta-Lactamase-Producing *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* Clinical Isolate. *Genome Announc.* 4, e00475-16.
- Gharout-Sait, A., Alsharapy, S.A., Brasme, L., Touati, A., Kermas, R., Bakour, S., Guillard, T., and de Champs, C. (2014). Enterobacteriaceae isolates carrying the New Delhi metallo-beta-lactamase gene in Yemen. *J. Med. Microbiol.* 63, 1316–1323.

- Giakkoupi, P., Papagiannitsis, C.C., Miriagou, V., Pappa, O., Polemis, M., Tryfinopoulou, K., Tzouvelekis, L.S., and Vatopoulos, A.C. (2011). An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1510–1513.
- Giske, C.G., Fröding, I., Hasan, C.M., Turlej-Rogacka, A., Toleman, M., Livermore, D., Woodford, N., and Walsh, T.R. (2012). Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of blaNDM-1 in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2735–2738.
- Glupczynski, Y., Huang, T.D., Bouchahrouf, W., Rezende De Castro, R., Bauraing, C., Gérard, M., Verbruggen, A.M., Deplano, A., Denis, O., and Bogaerts, P. (2012). Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39, 168–172.
- Goering, R. V (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect. Genet. Evol.* 10, 866–875.
- Gomez-Simmonds, A., Greenman, M., Sullivan, S.B., Tanner, J.P., Sowash, M.G., Whittier, S., and Uhlemann, A.-C. (2015). Population Structure of *Klebsiella pneumoniae* Causing Bloodstream Infections at a New York City Tertiary Care Hospital: Diversification of Multidrug-Resistant Isolates. *J Clin Microbiol* 53, 2060–2067.
- Gona, F., Barbera, F., Pasquariello, A.C., Grossi, P., Gridelli, B., Mezzatesta, M.L., Caio, C., Stefani, S., and Conaldi, P.G. (2014). In vivo multiclonal transfer of blaKPC-3 from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in surgery patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O633–O635.
- Göttig, S., Gruber, T.M., Stecher, B., Wichelhaus, T.A., and Kempf, V.A.J. (2015). In vivo horizontal gene transfer of the carbapenemase OXA-48 during a nosocomial outbreak. *Clin. Infect. Dis.* 60, 1808–1815.
- Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224.
- Grieß, E., Meckelein, B., Schulz, K., Seranski, P., and Setzke, E. (2007). Isolierung von DNA. In *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen Für Das Molekularbiologische Labor*, M. Jansohn, ed. (Elsevier Spektrum Akademischer Verlag), p. 91.
- Grimm, V., Ezaki, S., Susa, M., Knabbe, C., Schmid, R.D., and Bachmann, T.T. (2004). Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3766–3774.
- Gröbner, S., Linke, D., Schütz, W., Fladerer, C., Madlung, J., Autenrieth, I.B., Witte, W., and Pfeifer, Y. (2009). Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *J. Med. Microbiol.* 58, 912–922.
- Guo, Q., Spychala, C.N., McElheny, C.L., and Doi, Y. (2016). Comparative analysis of an IncR plasmid carrying armA, blaDHA-1 and qnrB4 from *Klebsiella pneumoniae* ST37 isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 882–886.
- Habeeb, M.A., Haque, A., Nematzadeh, S., Iversen, A., and Giske, C.G. (2013). High prevalence of 16S rRNA methylase RmtB among CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from Islamabad, Pakistan. *Int. J. Antimicrob. Agents* 41, 524–526.
- Hæggman, S., Löfdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J., and Brisse, S. (2004). Diversity and Evolution of the Class A Chromosomal Beta-Lactamase Gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2400–2408.

- Haller, S., Eller, C., Hermes, J., Kaase, M., Steglich, M., Radonić, A., Dabrowski, P.W., Nitsche, A., Pfeifer, Y., Werner, G., et al. (2015). What caused the outbreak of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit, Germany 2009 to 2012? Reconstructing transmission with epidemiological analysis and whole-genome sequencing. *BMJ Open* 5, e007397.
- Hammerum, A.M., Hansen, F., Olesen, B., Struve, C., Holzknecht, B.J., Andersen, P.S., Thye, A.-M., Jakobsen, L., Røder, B.L., Stegger, M., et al. (2017). Investigation of a possible outbreak of NDM-5-producing ST16 *Klebsiella pneumoniae* among patients in Denmark with no history of recent travel using whole-genome sequencing. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 3, 219–221.
- Hart, C., and Rao, S. (2000). Rhinoscleroma. *J. Med. Microbiol.* 49, 395–396.
- Head, S.R., Kiyomi Komori, H., LaMere, S.A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D.R., and Ordoukhanian, P. (2014). Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *Biotechniques* 56, 61–77.
- van Heesch, S., Mokry, M., Boskova, V., Junker, W., Mehon, R., Toonen, P., de Bruijn, E., Shull, J.D., Aitman, T.J., Cuppen, E., et al. (2013). Systematic biases in DNA copy number originate from isolation procedures. *Genome Biol.* 14, R33.
- Herschleb, J., Ananiev, G., and Schwartz, D.C. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat. Protoc.* 2, 677–684.
- Ho, P.-L., Li, Z., Lo, W.-U., Cheung, Y.-Y., Lin, C.-H., Sham, P.-C., Chi-Chung Cheng, V., Ng, T.-K., Que, T.-L., and Chow, K.-H. (2012). Identification and characterization of a novel incompatibility group X3 plasmid carrying blaNDM-1 in Enterobacteriaceae isolates with epidemiological links to multiple geographical areas in China. *Emerg. Microbes Infect.* 1, e39.
- Holt, K.E., Parkhill, J., Mazzoni, C.J., Roumagnac, P., Weill, X., Goodhead, I., Rance, R., Baker, S., Maskell, D.J., Dolecek, C., et al. (2009). High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi. *Nat. Genet.* 40, 987–993.
- Holt, K.E., Wertheim, H., Zadoks, R.N., Baker, S., Whitehouse, C.A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T.R., Hsu, L.Y., Severin, J., et al. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E3574–81.
- Horna, G., Velasquez, J., Fernández, N., Tamariz, J., and Ruiz, J. (2017). Characterisation of the first KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST340 from Peru. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 9, 36–40.
- Hornick, D.B., Allen, B.L., Horn, M.A., and Clegg, S. (1992). Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infect. Immun.* 60, 1577–1588.
- Hrabák, J., Študentová, V., Jakubů, V., Adámková, V., Dvořáková, L., Balejova, M., Bergerová, T., Chmelařová, E., Ježek, P., Kabelíková, P., et al. (2015). Prevalence study on carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Czech hospitals – results from Czech Part of European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE). *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 64, 87–91.
- Huang, W., Li, L., Myers, J.R., and Marth, G.T. (2012). ART: A next-generation sequencing read simulator. *Bioinformatics* 28, 593–594.
- Hudson, C.M., Bent, Z.W., Meagher, R.J., and Williams, K.P. (2014). Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. *PLoS One* 9.
- Illiaquer, M., Caroff, N., Bémer, P., Aubin, G.G., Juvin, M.E., Lepelletier, D., Reynaud, A., and Corvec, S. (2012). Occurrence and molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* ST37 clinical

isolates producing plasmid-mediated AmpC recovered over a 3-year period. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 74, 95–97.

Ito, R., Shindo, Y., Kobayashi, D., Ando, M., Jin, W., Wachino, J.I., Yamada, K., Kimura, K., Yagi, T., Hasegawa, Y., et al. (2015). Molecular epidemiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* associated with bacteremia among patients with pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 53, 879–886.

Izdebski, R., Bojarska, K., Baraniak, A., Literacka, E., Herda, M., Żabicka, D., Guzek, A., Półgrabia, M., Hryniewicz, W., and Gniadkowski, M. (2015). NDM-1- or OXA-48-producing Enterobacteriaceae colonising Polish tourists following a terrorist attack in Tunis, March 2015. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* 20, 1–4.

Jagnow, J., and Clegg, S. (2003). *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology* 149, 2397–2405.

Jin, Y., Shao, C., Li, J., Fan, H., Bai, Y., and Wang, Y. (2015). Outbreak of multidrug resistant NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from a neonatal unit in Shandong Province, China. *PLoS One* 10, 1–11.

Johnson, J.G., and Clegg, S. (2010). Role of MrkJ, a phosphodiesterase, in type 3 fimbrial expression and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 192, 3944–3950.

Johnson, J.G., Murphy, C.N., Sippy, J., Johnson, T.J., and Clegg, S. (2011). Type 3 fimbriae and biofilm formation are regulated by the transcriptional regulators MrkHI in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 193, 3453–3460.

Kaase, M., Schimanski, S., Schiller, R., Beyreiß, B., Thürmer, A., Steinmann, J., Kempf, V.A., Hess, C., Sobottka, I., Fenner, I., et al. (2016). Multicentre investigation of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in German hospitals. *Int. J. Med. Microbiol.* 306, 415–420.

Kaiser, T., Finstermeier, K., Häntzsch, M., Faucheux, S., Kaase, M., Eckmanns, T., Bercker, S., Kaisers, U.X., Lippmann, N., Rodloff, A.C., et al. (2017). Stalking a lethal superbug by whole-genome sequencing and phylogenetics: Influence on unraveling a major hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Am. J. Infect. Control.*

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., et al. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. In *Bioinformatics*, pp. 1647–1649.

Kim, J.O., Song, S.A., Yoon, E.-J., Shin, J.H., Lee, H., Jeong, S.H., and Lee, K. (2017). Outbreak of KPC-2-producing Enterobacteriaceae caused by clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST307 carrying an IncX3-type plasmid harboring a truncated Tn4401a. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 87, 343–348.

Knoop, V., and Müller, K. (2009a). Maximum Likelihood. In *Gene Und Stammbäume - Ein Handbuch Zur Molekularen Phylogenetik*, (Spektrum Akademischer Verlag), pp. 203–226.

Knoop, V., and Müller, K. (2009b). Distanzverfahren. In *Gene Und Stammbäume - Ein Handbuch Zur Molekularen Phylogenetik*, pp. 174–201.

Koboldt, D.C., Chen, K., Wylie, T., Larson, D.E., McLellan, M.D., Mardis, E.R., Weinstock, G.M., Wilson, R.K., and Ding, L. (2009). VarScan: Variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics* 25, 2283–2285.

Kocsis, E., Gužvinec, M., Butić, I., Krešić, S., Crnek, S.S., Tambić, A., Cornaglia, G., and Mazzariol, A. (2016). BlaNDM-1 Carriage on IncR Plasmid in Enterobacteriaceae Strains. *Microb. Drug Resist.*

22.

Kola, A., Piening, B., Pape, U.-F., Veltzke-Schlieker, W., Kaase, M., Geffers, C., Wiedenmann, B., and Gastmeier, P. (2015). An outbreak of carbapenem-resistant OXA-48 - producing *Klebsiella pneumoniae* associated to duodenoscopy. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 4, 8.

Kovács, K., Nyul, A., Mestyán, G., Melegh, S., Fenyvesi, H., Jakab, G., Szabó, H., Jánvári, L., Damjanova, I., and Tóth, Á. (2017). Emergence and interhospital spread of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* ST395 clone in Western Hungary. *Infect. Dis. (Auckl)*. 49, 231–233.

KRINKO (2012). Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* 55, 1311–1354.

Ktari, S., Mnif, B., Louati, F., Rekik, S., Mezghani, S., Mahjoubi, F., and Hammami, A. (2011). Spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing OXA-48 beta-lactamase in a Tunisian university hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1644–1646.

Lafeuille, E., Decré, D., Mahjoub-Messai, F., Bidet, P., Arlet, G., and Bingen, E. (2013). OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Libyan patients. *Microb. Drug Resist.* 19, 491–497.

Lamble, S., Batty, E., Attar, M., Buck, D., Bowden, R., Lunter, G., Crook, D., El-Fahmawi, B., and Piazza, P. (2013). Improved workflows for high throughput library preparation using the transposome-based nextera system. *BMC Biotechnol.* 13, 104.

Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R.L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D.W., Aarestrup, F.M., et al. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1355–1361.

Lascols, C., Hackel, M., Marshall, S.H., Hujer, A.M., Bouchillon, S., Badal, R., Hoban, D., and Bonomo, R.A. (2011). Increasing prevalence and dissemination of NDM-1 metallo- β -lactamase in India: Data from the SMART study (2009). *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1992–1997.

Lascols, C., Peirano, G., Hackel, M., Laupland, K.B., and Pitout, J.D.D. (2013). Surveillance and molecular epidemiology of *klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: First report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 130–136.

de Laveleye, M., Huang, T.D., Bogaerts, P., Berhin, C., Bauraing, C., Sacré, P., Noel, A., Glupczynski, Y., and On Behalf Of The Multicenter Study Group (2016). Increasing incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Belgian hospitals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1–8.

Lee, C.R., Lee, J.H., Park, K.S., Kim, Y.B., Jeong, B.C., and Lee, S.H. (2016a). Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front. Microbiol.* 7.

Lee, M.Y., Ko, K.S., Kang, C.I., Chung, D.R., Peck, K.R., and Song, J.H. (2011). High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: Diverse clones and clonal dissemination. *Int. J. Antimicrob. Agents* 38, 160–163.

Lee, R., Molton, J.S., Wyres, K.L., Gorrie, C., Wong, J., Hoh, C.H., Teo, J., Kalimuddin, S., Lye, D.C., Archuleta, S., et al. (2016b). Differential host susceptibility and bacterial virulence factors driving *Klebsiella* liver abscess in an ethnically diverse population. *Sci Rep. In press.*, 1–12.

Letunic, I., and Bork, P. (2016). Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* gkw290-.

- Levy, S.E., and Myers, R.M. (2016). Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 17, 95–115.
- Li, W. (2015). Automatically estimate insert size of the paired-end reads for a given SAM/BAM file.
- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079.
- Li, W., Sun, G., Yu, Y., Li, N., Chen, M., Jin, R., Jiao, Y., and Wu, H. (2014). Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Clin. Infect. Dis.* 58, 225–232.
- Li, X., Zhang, J., and Gu, H. (2011). Adsorption and desorption behaviors of DNA with magnetic mesoporous silica nanoparticles. *Langmuir* 27, 6099–6106.
- Liapis, E., Pantel, A., Robert, J., Nicolas-Chanoine, M.H., Cavalié, L., Van der Mee-Marquet, N., De Champs, C., Aissa, N., Eloy, C., Blanc, V., et al. (2014). Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O1121–O1123.
- Lin, A.C., Liao, T.L., Lin, Y.C., Lai, Y.C., Lu, M.C., and Chen, Y.T. (2012). Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* 1084, a hypermucoviscosity-negative K1 clinical strain. *J. Bacteriol.* 194, 6316.
- Lin, W.-P., Wang, J.-T., Chang, S.-C., Chang, F.-Y., Fung, C.-P., Chuang, Y.-C., Chen, Y.-S., Shiau, Y.-R., Tan, M.-C., Wang, H.-Y., et al. (2016). The Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* from Community Settings in Taiwan, a Trend Analysis. *Sci. Rep.* 6, 36280.
- Lippa, A.M., and Goulian, M. (2009). Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genet.* 5.
- Lippmann, N., Lübbert, C., Kaiser, T., Kaisers, U.X., and Rodloff, A.C. (2014). Clinical epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect. Dis.* 14, 271–272.
- Little, M.L., Qin, X., Zerr, D.M., and Weissman, S.J. (2014). Molecular epidemiology of colonizing and disease-causing *klebsiella pneumoniae* in paediatric patients. *J. Med. Microbiol.* 63, 610–616.
- Liu, P., Li, P., Jiang, X., Bi, D., Xie, Y., Tai, C., Deng, Z., Rajakumar, K., and Ou, H.Y. (2012). Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286, a multidrug-resistant strain isolated from human sputum. *J. Bacteriol.* 194, 1841–1842.
- Liu, Y., Wan, L.-G., Deng, Q., Cao, X.-W., Yu, Y., and Xu, Q.-F. (2015). First description of NDM-1-, KPC-2-, VIM-2- and IMP-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a single Chinese teaching hospital. *Epidemiol. Infect.* 143, 376–384.
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 161–168.
- Livermore, D.M. (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 557–584.
- Livermore, D.M. (2008). Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 3–10.

- Löhr, I.H., Hülter, N., Bernhoff, E., Johnsen, P.J., Sundsfjord, A., and Naseer, U. (2015). Persistence of a pKPN3-like CTX-M-15-encoding IncFIIK plasmid in a *Klebsiella pneumoniae* ST17 host during two years of intestinal colonization. *PLoS One* 10, 1–16.
- Long, S.W., Linson, S.E., Ojeda Saavedra, M., Cantu, C., Davis, J.J., Brettin, T., and Olsen, R.J. (2017). Whole-Genome Sequencing of Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Reveals Misidentification and Misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. *mSphere* 2, e00290-17.
- Lopez-Camacho, E., Gomez-Gil, R., Tobes, R., Manrique, M., Lorenzo, M., Galvan, B., Salvarelli, E., Moatassim, Y., Salanueva, I.J., Pareja, E., et al. (2014). Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 632–636.
- López-Camacho, E., Rentero, Z., Ruiz-Carrascoso, G., Wesselink, J.J., Pérez-Vázquez, M., Lusa-Bernal, S., Gómez-Puertas, P., Kingsley, R.A., Gómez-Sánchez, P., Campos, J., et al. (2014). Design of clone-specific probes from genome sequences for rapid PCR-typing of outbreak pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O891–O893.
- Ludden, C., Cormican, M., Vellinga, A., Johnson, J.R., Austin, B., and Morris, D. (2015). Colonisation with ESBL-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, vancomycin-resistant enterococci, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a long-term care facility over one year. *BMC Infect. Dis.* 15, 168.
- Lunha, K., Chanawong, A., Lulitanond, A., Wilailuckana, C., Charoensri, N., Wonglakorn, L., Saenjamla, P., Chaimanee, P., Angkititrakul, S., and Chetchotisakd, P. (2017). High-level carbapenem-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* with a novel OmpK36 variant and low-level, carbapenem-resistant, non-porin-deficient, OXA-181-producing *Escherichia coli* from Thailand. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 85, 221–226.
- Ma, L., Lu, P.L., Kristopher Siu, L., and Hsieh, M.H. (2013). Molecular typing and resistance mechanisms of imipenem-non-susceptible *klebsiella pneumoniae* in Taiwan: Results from the Taiwan surveillance of antibiotic resistance (TSAR) study, 2002-2009. *J. Med. Microbiol.* 62, 101–107.
- Ma, L., Wang, J.T., Wu, T.L., Siu, L.K., Chuang, Y.C., Lin, J.C., Lu, M.C., and Lu, P.L. (2015). Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS One* 10.
- Maatallah, M., Vading, M., Kabir, M.H., Bakhrouf, A., Kalin, M., Naucélér, P., Brisse, S., and Giske, C.G. (2014). *Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the Stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae*. *PLoS One* 9.
- Machuca, J., López-Cerero, L., Fernández-Cuenca, F., Gracia-Ahufinger, I., Ruiz-Carrascoso, G., Rodríguez-López, F., and Pascual, Á. (2016). Characterization of an outbreak due to CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* lacking the blaOXA-48 gene belonging to clone ST405 in a neonatal unit in southern Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2353–2355.
- Marcade, G., Brisse, S., Bialek, S., Marcon, E., Leflon-Guibout, V., Passet, V., Moreau, R., and Nicolas-Chanoine, M.-H. (2012). The emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* of international clones ST13, ST16, ST35, ST48 and ST101 in a teaching hospital in the Paris region. *Epidemiol. Infect.* doi:10.1017, 1–8.
- Markovska, R., Stoeva, T., Schneider, I., Boyanova, L., Popova, V., Dacheva, D., Kaneva, R., Bauernfeind, A., Mitev, V., and Mitov, I. (2015). Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. *APMIS* 123, 887–894.
- Marsh, J.W., Krauland, M.G., Nelson, J.S., Schlackman, J.L., Brooks, A.M., Pasculle, A.W., Shutt, K.A., Doi, Y., Query, A.M., Muto, C.A., et al. (2015). Genomic epidemiology of an endoscope-

associated outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. *PLoS One* 10.

Martínez-Martínez, L. (2008). Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 Suppl 1, 82–89.

Martins, W.M.B.S., Almeida, A.C.S., Nicoletti, A.G., Cayô, R., Gales, A.C., Alves, L.C., Brayner, F.B., Vilela, M.A., and Morais, M.M.C. (2015). Coproduction of KPC-2 and QnrB19 in *Klebsiella pneumoniae* ST340 isolate in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 83, 375–376.

Mataseje, L.F., Boyd, D.A., Willey, B.M., Prayitno, N., Kreiswirth, N., Gelosia, A., Poutanen, S.M., Low, D.E., Jenkins, S.G., Katz, K., et al. (2011). Plasmid comparison and molecular analysis of *Klebsiella pneumoniae* harbouring blaKPC from New York city and Toronto. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1273–1277.

Mathers, A.J., Cox, H.L., Kitchel, B., Bonatti, H., Brassinga, A.K.C., Carroll, J., Scheld, W.M., Hazen, K.C., and Sifri, C.D. (2011). Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant enterobacteriaceae reveals Intergenous KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. *MBio* 2.

Mathers, A.J., Peirano, G., and Pitout, J.D.D. (2015a). The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 565–591.

Mathers, A.J., Stoesser, N., Sheppard, A.E., Pankhurst, L., Giess, A., Yeh, A.J., Didelot, X., Turner, S.D., Sebra, R., Kasarskis, A., et al. (2015b). *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* at a single institution: Insights into endemicity from Whole-genome sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1656–1663.

Mathers, A.J., Stoesser, N., Chai, W., Carroll, J., Barry, K., Cherunvanky, A., Sebra, R., Kasarskis, A., Peto, T.E., Walker, A.S., et al. (2017). Chromosomal integration of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene, blaKPC, in *Klebsiella* species is elusive but not rare. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61.

Meletis, G. (2016). Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther. Adv. Infect. Dis.* 3, 15–21.

De Melo, M.E.S., Cabral, A.B., MacIel, M.A. V, Da Silveira, V.M., and De Souza Lopes, A.C. (2011). Phylogenetic groups among *Klebsiella pneumoniae* isolates from Brazil: Relationship with antimicrobial resistance and origin. *Curr. Microbiol.* 62, 1596–1601.

Melzak, K. a., Sherwood, C.S., Turner, R.F.B., and Haynes, C. a. (1996). Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 181, 635–644.

Mezzatesta, M.L., Gona, F., Caio, C., Adembri, C., Dell’utri, P., Santagati, M., and Stefani, S. (2013). Emergence of an extensively drug-resistant armA- and KPC-2-producing ST101 *Klebsiella pneumoniae* clone in Italy. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1932–1934.

Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215.

Morris, D., O’Connor, M., Izdebski, R., Corcoran, M., Ludden, C.E., McGRATH, E., Buckley, V., Cryan, B., Gniadkowski, M., and Cormican, M. (2015). Dissemination of clonally related multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Ireland. *Epidemiol. Infect.* 1–6.

Mshana, S.E., Hain, T., Domann, E., Lyamuya, E.F., Chakraborty, T., Imirzalioglu, C., Moyo, S., Aboud, S., Kasubi, M., Lyamuya, E., et al. (2013). Predominance of *Klebsiella pneumoniae* ST14 carrying CTX-M-15 causing neonatal sepsis in Tanzania. *BMC Infect. Dis.* 13, 466.

- Nagasaka, Y., Kimura, K., Yamada, K., Wachino, J.-I., Jin, W., Notake, S., Yanagisawa, H., and Arakawa, Y. (2015). Genetic profiles of fluoroquinolone-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* among cephalosporin-resistant *K. pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* 21, 224–233.
- Napier, B.A., Burd, E.M., Satola, S.W., Cagle, S.M., Ray, S.M., McGann, P., Pohl, J., Lesho, E.P., and Weiss, D.S. (2013). Clinical use of colistin induces cross-resistance to host antimicrobials in *Acinetobacter baumannii*. *MBio* 4.
- Netikul, T., and Kiratisin, P. (2015). Genetic characterization of carbapenem-resistant enterobacteriaceae and the spread of carbapenem-resistant *klebsiella pneumonia* ST340 at a university hospital in Thailand. *PLoS One* 10, 1–14.
- Nielsen, J.B., Skov, M.N., Jørgensen, R.L., Heltberg, O., Hansen, D.S., and Schønning, K. (2011). Identification of CTX-M15-, SHV-28-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 as an epidemic clone in the Copenhagen area using a semi-automated Rep-PCR typing assay. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 773–778.
- Ning, C., Hu, L., Wang, H., Zhong, Q., Hang, Y., Hu, X., Wang, X., and Xiong, J. (2015). Study on the multilocus sequence typing of carbapenem resistant *Klebsiella pneumonia*. *Chinese J. Clin. Pharmacol.*
- Nordmann, P. (2014). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge. *Médecine Mal. Infect.* 44, 51–56.
- Novais, Â., Rodrigues, C., Branquinho, R., Antunes, P., Grosso, F., Boaventura, L., Ribeiro, G., and Peixe, L. (2012). Spread of an OmpK36-modified ST15 *Klebsiella pneumoniae* variant during an outbreak involving multiple carbapenem-resistant Enterobacteriaceae species and clones. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 3057–3063.
- Novović, K., Trudić, A., Brkić, S., Vasiljević, Z., Kojić, M., Medić, D., Ćirković, I., and Jovčić, B. (2017). Molecular epidemiology of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, Serbia, 2013–2016. *Antimicrob. Agents Chemother.* AAC.02550-16.
- Olaitan, A., Morand, S., and Rolain, J.M. (2014a). Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* 5.
- Olaitan, A.O., Diene, S.M., Kempf, M., Berrazeg, M., Bakour, S., Gupta, S.K., Thongmalayvong, B., Akkhavong, K., Somphavong, S., Paboriboune, P., et al. (2014b). Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: An epidemiological and molecular study. *Int. J. Antimicrob. Agents* 44, 500–507.
- Olaitan, A.O., Morand, S., and Rolain, J.M. (2016). Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: A new worry and cause for vigilance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 47, 1–3.
- Orsi, G.B., García-Fernández, A., Giordano, A., Venditti, C., Bencardino, A., Gianfreda, R., Falcone, M., Carattoli, A., and Venditti, M. (2011). Risk factors and clinical significance of ertapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients. *J. Hosp. Infect.* 78, 54–58.
- Orsi, G.B., Bencardino, A., Vena, A., Carattoli, A., Venditti, C., Falcone, M., Giordano, A., and Venditti, M. (2013). Patient risk factors for outer membrane permeability and KPC-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolation: Results of a double case-control study. *Infection* 41, 61–67.
- Österblad, M., Kirveskari, J., Hakanen, A.J., Tissari, P., Vaara, M., and Jalava, J. (2012). Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Finland: The first years (2008–11). *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2860–2864.

- Oteo, J., Saez, D., Bautista, V., Fernández-Romero, S., Hernández-Molina, J.M., Pérez-Vázquez, M., Aracil, B., and Campos, J. (2013a). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 6344–6347.
- Oteo, J., Hernández, J.M., Espasa, M., Fleites, A., Sáez, D., Bautista, V., Pérez-Vázquez, M., Fernández-García, M.D., Delgado-Iribarren, A., Sánchez-Romero, I., et al. (2013b). Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 317–321.
- Oteo, J., Pérez-Vázquez, M., Bautista, V., Ortega, A., Zamarrón, P., Saez, D., Fernández-Romero, S., Lara, N., Ramiro, R., Aracil, B., et al. (2016). The spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Spain: WGS analysis of the emerging high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* ST11/KPC-2, ST101/KPC-2 and ST512/KPC-3. *J. Antimicrob. Chemother.* dkw321.
- Ozer, E.A., Morris, A.R., Krapp, F., Henry, C.S., Tyo, K.E., Lathem, W.W., and Hauser, A.R. (2016). Draft Genome Sequence of a Multidrug-Resistant *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* Isolate from a Clinical Source. *Genome Announc.* 4, e00422-16.
- Paczosa, M.K., and Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 629–661.
- Palacios-Baena, Z.R., Oteo, J., Conejo, C., Larrosa, M.N., Bou, G., Fernández-Martínez, M., González-López, J.J., Pintado, V., Martínez-Martínez, L., Merino, M., et al. (2016). Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain. *J. Infect.* 72, 152–160.
- Pan, Y.J., Lin, T.L., Chen, Y.H., Hsu, C.R., Hsieh, P.F., Wu, M.C., and Wang, J.T. (2013). Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* revisited by *wzc* sequencing. *PLoS One* 8.
- Pan, Y.J., Lin, T.L., Lin, Y.T., Su, P.A., Chen, C.T., Hsieh, P.F., Hsu, C.R., Chen, C.C., Hsieh, Y.C., and Wang, J.T. (2015). Identification of capsular types in carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* strains by *wzc* sequencing and implications for capsule depolymerase treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1038–1047.
- Pannaraj, P.S., Bard, J.D., Cerini, C., and Weissman, S.J. (2015). Pediatric carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Los Angeles, California, a high-prevalence region in the United States. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 34, 11–16.
- Paño-Pardo, J.R., Ruiz-Carrascoso, G., Navarro-San Francisco, C., Gómez-Gil, R., Mora-Rillo, M., Romero-Gómez, M.P., Fernández-Romero, N., García-Rodríguez, J., Pérez-Blanco, V., Moreno-Ramos, F., et al. (2013). Infections caused by oxa-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 89–96.
- Pantelidou, I.M., Galani, I., Georgitsi, M., Daikos, G.L., and Giamarellos-Bourboulis, E.J. (2015). Interactions of *klebsiella pneumoniae* with the innate immune system vary in relation to clone and resistance phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 7036–7043.
- Paterson, D.L., and Bonomo, R.A. (2005). Extended-Spectrum beta-Lactamases : a Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 657–686.
- Pecora, N.D., Li, N., Allard, M., Li, C., Albano, E., Delaney, M., Dubois, A., Onderdonk, A.B., and Bry, L. (2015). Genomically informed surveillance for carbapenem-resistant enterobacteriaceae in a health care system. *MBio* 6.
- Peirano, G., Hung King Sang, J., Pitondo-silva, A., Laupland, K.B., and Pitout, J.D.D. (2012). Molecular epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* over

a 10 year period in Calgary, Canada. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1114–1120.

Peirano, G., Ahmed-Bentley, J., Fuller, J., Rubin, J.E., and Pitout, J.D.D. (2014). Travel-related carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Alberta, Canada: The first 3 years. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1575–1581.

Pena, I., Picazo, J.J., Rodríguez-Avial, C., and Rodríguez-Avial, I. (2017). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* 43, 460–464.

Pereira, P.S., De araujo, C.F.M., Seki, L.M., Zahner, V., Carvalho-Assef, A.P.D.A., and Asensi, M.D. (2013). Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: Spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 312–316.

Pereira, P.S., Borghi, M., De Araújo, C.F.M., Aires, C.A.M., Oliveira, J.C.R., Asensi, M.D., and Carvalho-Assef, A.P.D.A. (2015). Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 4453–4456.

Pfeifer, Y., Wilharm, G., Zander, E., Wichelhaus, T.A., Göttig, S.G., Hunfeld, K.P., Seifert, H., Witte, W., and Higgins, P.G. (2011). Molecular characterization of bla_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1998–2001.

Pfennigwerth, N. (2017). Bericht des NRZ für gramnegative Krankenhauserreger. *Epidemiol. Bull.* 26, 229–233.

Pitout, J.D.D., Nordmann, P., and Poirel, L. (2015). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 5873–5884.

Podschun, R., and Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 589–603.

Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., and Nordmann, P. (2004). Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 15–22.

Poirel, L., Dortet, L., Bernabeu, S., and Nordmann, P. (2011). Genetic features of bla_{NDM-1}-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5403–5407.

Poirel, L., Jayol, A., Bontron, S., Villegas, M.V., Ozdamar, M., Türkoglu, S., and Nordmann, P. (2015). The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 75–80.

Potron, A., Kalpoe, J., Poirel, L., and Nordmann, P. (2011). European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin. Microbiol. Infect.* 17.

Potron, A., Poirel, L., Rondinaud, E., and Nordmann, P. (2013). Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Eurosurveillance* 18.

Providenti, M.A., O'Brien, J.M., Ewing, R.J., Paterson, E.S., and Smith, M.L. (2006). The copy-number of plasmids and other genetic elements can be determined by SYBR-Green-based quantitative real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 65, 476–487.

Qi, Y., Wei, Z., Li, L., Ji, S., Du, X., Shen, P., and Yu, Y. (2010). Detection of a common plasmid carrying bla_{KPC-2} in Enterobacteriaceae isolates from distinct cities in China. *Microb. Drug Resist.* 16, 297–301.

Qi, Y., Wei, Z., Ji, S., Du, X., Shen, P., and Yu, Y. (2011). ST11, the dominant clone of KPC-

producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 307–312.

Quiñones, D., Valverde, A., Rodríguez-Baños, M., Kobayashi, N., Zayaz, A., Abreu, M., Cantón, R., and del Campo, R. (2014). High clonal diversity in a non-outbreak situation of clinical ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the first national surveillance program in Cuba. *Microb. Drug Resist.* 20, 45–51.

Rafiq, Z., Sam, N., and Vaidyanathan, R. (2016). Whole genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* U25, a hypermucoviscous, multidrug resistant, biofilm producing isolate from India. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 111, 144–146.

Ramos, P.I.P., Picão, R.C., Almeida, L.G.P. de, Lima, N.C.B., Girardello, R., Vivan, A.C.P., Xavier, D.E., Barcellos, F.G., Pelisson, M., Vespero, E.C., et al. (2014). Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC Genomics* 15, 54.

Rhoads, A., and Au, K.F. (2015). PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* 13, 278–289.

Ribot, E.M., Fair, M. a, Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., and Barrett, T.J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 59–67.

Richter, S.N., Frasson, I., Franchin, E., Bergo, C., Lavezzo, E., Barzon, L., Cavallaro, A., and Palù, G. (2012). KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009–December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. *Gut Pathog.* 4, 7.

Robert Koch-Institut (2014). Plasmid-vermittelter Multispezies-Ausbruch mit Carbapenem-resistenten Enterobacteriaceae. *Epidemiol. Bull.* 47, 455–459.

Robert Koch-Institut (2016). Bericht: Ausbruch durch ESBL *Klebsiella pneumoniae* in Berlin, 2015.

Rodrigues, C., Machado, E., Ramos, H., Peixe, L., and Novais, Â. (2014). Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK). *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 1100–1108.

Rosenblueth, M., Martínez, L., Silva, J., and Martínez-Romero, E. (2004). *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 27–35.

Ruiz-Garbajosa, P., Hernández-García, M., Beatobe, L., Tato, M., Méndez, M.I., Grandal, M., Aranzabal, L., Alonso, S., López, M.Á., Astray, J., et al. (2016). A single-day point-prevalence study of faecal carriers in long-term care hospitals in Madrid (Spain) depicts a complex clonal and polyclonal dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 348–352.

Sabirova, J.S., Xavier, B.B., Coppens, J., Zarkotou, O., Lammens, C., Janssens, L., Burggrave, R., Wagner, T., Goossens, H., and Malhotra-Kumar, S. (2016). Whole-genome typing and characterization of blaVIM19-harboring ST383 *Klebsiella pneumoniae* by PFGE, whole-genome mapping and WGS. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 1501–1509.

Sánchez-Romero, I., Asensio, A., Oteo, J., Muñoz-Algarra, M., Isidoro, B., Vindel, A., Alvarez-Avello, J., Balandín-Moreno, B., Cuevas, O., Fernández-Romero, S., et al. (2012). Nosocomial outbreak of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of multilocus sequence type 15: molecular basis, clinical risk factors, and outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 420–427.

Sandegren, L., Linkevicius, M., Lytsy, B., Melhus, Å., and Andersson, D.I. (2012). Transfer of an

Escherichia coli ST131 multiresistance cassette has created a *Klebsiella pneumoniae*-specific plasmid associated with a major nosocomial outbreak. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 74–83.

Seeberger, P.H., Pereira, C.L., Khan, N., Xiao, G., Diago-Navarro, E., Reppe, K., Opitz, B., Fries, B.C., and Witzenrath, M. (2017). A Semi-Synthetic Glycoconjugate Vaccine Candidate for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 56, 13973–13978.

Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069.

Seki, L.M., Pereira, P.S., de Souza, M. da P.A.H., Conceição, M. de S., Marques, E.A., Porto, C.O., Colnago, E.M.L., Alves, C. de F.M., Gomes, D., Assef, A.P.D.A.C., et al. (2011). Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: The predominance of sequence type 437. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70, 274–277.

Shin, J., and Soo Ko, K. (2014). Single origin of three plasmids bearing blaCTX-M-15 from different *Klebsiella pneumoniae* clones. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 969–972.

Shon, A.S., Bajwa, R.P.S., and Russo, T.A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence* 4, 107–118.

Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., and Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, D32–6.

Skálová, A., Chudějová, K., Rotová, V., Medvecký, M., Študentová, V., Chudáčková, E., Lavicka, P., Bergerova, T., Jakubu, V., Zemlickova, H., et al. (2016). Molecular characterization of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* in the Czech Republic: evidence for horizontal transfer of pOXA-48-like plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* AAC.01889-16.

Škulj, M., Okršlar, V., Jalen, Š., Jevševar, S., Slanc, P., Štrukelj, B., and Menart, V. (2008). Improved determination of plasmid copy number using quantitative real-time PCR for monitoring fermentation processes. *I2*, 1–12.

Smith Moland, E., Hanson, N.D., Herrera, V.L., Black, J. a, Lockhart, T.J., Hossain, A., Johnson, J. a, Goering, R. V, and Thomson, K.S. (2003). Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 711–714.

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313.

Steinmann, J., Kaase, M., Gatermann, S., Popp, W., Steinmann, E., Damman, M., Paul, A., Saner, F., Buer, J., and Rath, P.M. (2011). Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. *Eurosurveillance* 16.

Stoesser, N., Giess, A., Batty, E.M., Sheppard, A.E., Walker, A.S., Wilson, D.J., Didelot, X., Bashir, A., Sebra, R., Kasarskis, A., et al. (2014). Genome sequencing of an extended series of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from neonatal infections in a Nepali hospital characterizes the extent of community- Versus hospital- associated transmission in an endemic setting. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7347–7357.

Struve, C., Bojer, M., Nielsen, E.M., Hansen, D.S., and Krogfelt, K.A. (2005). Investigation of the putative virulence gene magA in a worldwide collection of 495 *Klebsiella* isolates: magA is restricted to the gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* capsule serotype K1 [1]. *J. Med. Microbiol.* 54, 1111–1113.

Struve, C., Bojer, M., and Krogfelt, K.A. (2009). Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infect. Immun.* 77, 5016–5024.

- Suh, J.Y., Son, J.S., Chung, D.R., Peck, K.R., Ko, K.S., and Song, J.H. (2010). Nonclonal emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood samples in South Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 560–562.
- Tan, S.C., and Yiap, B.C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J. Biomed. Biotechnol.* 2009.
- Tarkkanen, A.M., Virkola, R., Clegg, S., and Korhonen, T.K. (1997). Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infect. Immun.* 65, 1546–1549.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R. V, Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., and Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33, 2233–2239.
- Treangen, T.J., and Salzberg, S.L. (2011). Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nat. Rev. Genet.* 13, 36–46.
- Tzouvelekis, L.S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P.T., and Daikos, G.L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 682–707.
- uz Zaman, T., Aldrees, M., Al Johani, S.M., Alrodayyan, M., Aldughashem, F.A., and Balkhy, H.H. (2014). Multi-drug carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection carrying the OXA-48 gene and showing variations in outer membrane protein 36 causing an outbreak in a tertiary care hospital in Riyadh, Saudi Arabia. *Int. J. Infect. Dis.* 28, e186–e192.
- Velkov, T., Roberts, K.D., Nation, R.L., Thompson, P.E., and Li, J. (2013). Pharmacology of polymyxins: new insights into an “old” class of antibiotics. *Futur. Microbiol* 8, 1–20.
- Wendt, C., Schütt, S., Dalpke, A.H., Konrad, M., Mieth, M., Trierweiler-Hauke, B., Weigand, M.A., Zimmermann, S., Biehler, K., and Jonas, D. (2010). First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 563–570.
- World Health Organization (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. *Who* 8.
- Wright, M.S., Perez, F., Brinkac, L., Jacobs, M.R., Kaye, K., Cober, E., Van Duin, D., Marshall, S.H., Hujer, A.M., Rudin, S.D., et al. (2014). Population structure of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from midwestern U.S. hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4961–4965.
- Wright, M.S., Suzuki, Y., Jones, M.B., Marshall, S.H., Rudin, S.D., Van Duin, D., Kaye, K., Jacobs, M.R., Bonomo, R.A., and Adamsa, M.D. (2015). Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 536–543.
- Wyres, K.L., and Holt, K.E. (2016). *Klebsiella pneumoniae* population genomics and antimicrobial-resistant clones. *Trends Microbiol.* 24, 944–956.
- Wyres, K., Wick, R.R., Gorrie, C., Jenney, A., Follador, R., Thomson, N.R., and Holt, K.E. (2016). Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data.
- Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhel, R., Malhotra-Kumar, S., Butaye, P., Goossens, H., and Malhotra-Kumar, S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistinresistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, june 2016. *Eurosurveillance* 21.
- Xiao, S., Wang, S., Wu, W., Zhao, S., Gu, F., Ni, Y., Guo, X., Qu, J., and Han, L. (2017). The Resistance Phenotype and Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* in Bloodstream Infections in Shanghai, China, 2012–2015. *Front. Microbiol.* 8, 1–8.

- Yan, J.J., Wang, M.C., Zheng, P.X., Tsai, L.H., and Wu, J.J. (2015). Associations of the major international high-risk resistant clones and virulent clones with specific ompK36 allele groups in *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *New Microbes New Infect.* 5, 1–4.
- Yang, J., Ye, L., Guo, L., Zhao, Q., Chen, R., Luo, Y., Chen, Y., Tian, S., Zhao, J., Shen, D., et al. (2013). A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: Dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. *Clin. Microbiol. Infect.* 19.
- Yang, Q., Fang, L., Fu, Y., Du, X., Shen, Y., and Yu, Y. (2015). Dissemination of NDM-1-producing Enterobacteriaceae mediated by the IncX3-type plasmid. *PLoS One* 10.
- Yao, Y., Imirzalioglu, C., Hain, T., Kaase, M., Gatermann, S., Exner, M., Mielke, M., Hauri, A., Dragneva, Y., Bill, R., et al. (2014). Complete Nucleotide Sequence of a *Citrobacter freundii* Plasmid Carrying KPC-2 in a Unique Genetic Environment. *Genome Announc.* 2, e01157-14.
- Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, C.D., Alberti, S., Bush, K., and Tenover, F.C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1151–1161.
- Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., Zhang, R., Walsh, T.R., Shen, J., and Wang, Y. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. *MBio* 8.
- Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., and Walsh, T.R. (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 5046–5054.
- Yu, W.-L., Lee, M.-F., Tang, H.-J., Chang, M.-C., and Chuang, Y.-C. (2015). Low prevalence of rmpA and high tendency of rmpA mutation correspond to low virulence of extended spectrum β -lactamase-producing *klebsiella pneumoniae* isolates. *Virulence* 6, 162–172.
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F.M., and Larsen, M.V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2640–2644.
- Zeng, X., and Lin, J. (2013). Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front. Microbiol.* 4.
- Zhang, R., Wang, X., and Lü, J. (2014). [Isolation of a carbapenem-resistant K1 serotype *Klebsiella pneumoniae* strain and the study of resistance mechanism]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 94, 3666–3670.
- Zhang, R., Lin, D., Chan, E.W., Gu, D., and Chen, G. (2016). Emergence of Carbapenem-Resistant Serotype K1 Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strains in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 709–711.
- Zhang, X., Li, X., Wang, M., Yue, H., Li, P., Liu, Y., Cao, W., Yao, D., Liu, L., Zhou, X., et al. (2015). Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* causing neonatal infection in a teaching hospital in mainland China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 4349–4351.
- Zhou, K., Lokate, M., Deurenberg, R.H., Arends, J., Foe, J.L. Ten, Grundmann, H., Rossen, J.W.A., and Friedrich, A.W. (2015). Characterization of a CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak strain assigned to a novel sequence type (1427). *Front. Microbiol.* 6.
- Zhou, K., Lokate, M., Deurenberg, R.H., Tepper, M., Arends, J.P., Raangs, E.G.C., Lo-Ten-Foe, J., Grundmann, H., Rossen, J.W.A., and Friedrich, A.W. (2016). Use of whole-genome sequencing to trace, control and characterize the regional expansion of extended-spectrum β -lactamase producing ST15 *Klebsiella pneumoniae*. *Sci. Rep.* 6, 20840.

- Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K.H., Dennis, J.J., and Wishart, D.S. (2011). PHAST: A Fast Phage Search Tool. *Nucleic Acids Res.* 39.
- Zhu, J., Ding, B., Xu, X., Zhu, D., Yang, F., Zhang, H., and Hu, F. (2015). *Klebsiella pneumoniae*: Development of carbapenem resistance due to acquisition of blaNDM-1 during antimicrobial therapy in twin infants with pneumonia. *Front. Microbiol.* 6, 1–5.
- Zhu, J., Sun, L., Ding, B., Yang, Y., Xu, X., Liu, W., Zhu, D., Yang, F., Zhang, H., and Hu, F. (2016). Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST76 and ST37 isolates in neonates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 611–618.
- Zurfluh, K., Poirel, L., Nordmann, P., Klumpp, J., and Stephan, R. (2015). First detection of *Klebsiella variicola* producing OXA-181 carbapenemase in fresh vegetable imported from Asia to Switzerland. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 4, 38.
- Zweigner, J., Gastmeier, P., Kola, A., Klefisch, F.R., Schweizer, C., and Hummel, M. (2014). A carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak following bronchoscopy. *Am. J. Infect. Control* 42, 936–937.

Tabelle A 1 Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten Carbapenemase-produzierenden *Klebsiella*-Isolate aus Deutschland

RKI-ID: RKI-interne Isolatnummer; Jahr: Jahr, in dem das sequenzierte Isolat abgenommen wurde; Land: Abkürzung für Bundesland, aus dem das Isolat stammt; Material: Patientenmaterial, aus dem das Isolat kultiviert wurde; Carbapenemase: nachgewiesene Carbapenemase; MLST: Sequenztyp; *wzi*: Ergebnis der Kapseltypisierung über Bestimmung des *wzi*-Allels, Beta-Laktamase-Gene: Beta-Laktamase-Gene, die neben dem Carbapenemase-Gen in den Ganzgenom-Daten identifiziert wurden (die Zahl gibt das Allel an); Virulenzgene: Virulenzgene, die in den Ganzgenom-Daten identifiziert wurden (Veränderungen: * Transposase im *mrkH*-Gen, ** Transposase im *mrkH*- und im *mrkI*-Gen, *** Transposase im *mrkJ*-Gen, **** vorzeitiges Stoppcodon im *ybtA*-Gen, ***** vorzeitiges Stoppcodon im *irp2*-Gen)

RKI-ID	Jahr	Land	Material	Carbapenemase	ST	<i>wzi</i>	Beta-Laktamase-Gene							Virulenzfaktoren			
							<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{LEN}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{CMY}	<i>bla</i> _{VEB}	<i>mrk</i>	Yersiniabactin	kfu	Aerobactin
270/15	2010	BW	Urin	KPC-2	258	29	12	-	-	1	-	-	-	+ *	+	-	-
271/15	2010	NW	Urin	KPC-2	340	50	11	-	-	1	9	-	-	+	-	-	-
272/15	2010	RP	Rachenabstrich	KPC-2	147	64	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
274/15	2011	BW	Vaginalabstrich	KPC-2	147	unbekannt	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
275/15	2011	NW	Punktat	KPC-2	347	553	-	27	-	-	-	-	-	+ **	-	-	-
276/15	2011	NI	Laschensekret	KPC-2	101	137	1	-	15	1	-	-	-	+	+ ****	+	-
278/15	2012	NW	Urin	KPC-2	258	83	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
279/15	2012	BE	Urin	KPC-2	258	29	11	-	-	-	-	-	-	+ *	+	-	-
280/15	2012	ST	Urin	KPC-2	258	29	12	-	-	1	-	-	-	+ *	-	-	-
281/15	2012	BW	Analabstrich	KPC-2	258	29	12	-	-	1	-	-	-	+ *	+	-	-
283/15	2013	SN	Achselabstrich	KPC-2	258	29	12	-	-	-	-	-	-	+ *	-	-	-
284/15	2013	NW	Urin	KPC-2	258	29	12	-	-	1	-	-	-	+ *	-	-	-
286/15	2014	SN	Analabstrich	KPC-2	258	29	11	-	-	1	-	-	-	+ *	-	-	-
287/15	2014	BW	Urin	KPC-2	258	29	12	-	-	1	-	-	-	+ *	-	-	-
288/15	2010	BY	Urin	KPC-3	258	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
289/15	2010	SN	Urin	KPC-3	512	154	11	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
290/15	2010	NW	Wundabstrich	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
292/15	2011	BY	Wundabstrich	KPC-3	258	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
294/15	2012	NW	Sputum	KPC-3	512	154	11	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
295/15	2012	BW	Urin	KPC-3	258	154	11	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
297/15	2013	BW	Urin	KPC-3	258	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-

RKI-ID	Jahr	BL	Isolatquelle	Carbapenemase	ST	wzi	Beta-Laktamase-Gene							Virulenzfaktoren			
							<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{LEN}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{CMY}	<i>bla</i> _{VEB}	mrk	Yersiniabactin	kfu	Aerobactin
299/15	2014	BY	Wundabstrich	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
301/15	2010	HE	Urin	OXA-48	16	50	1	-	15	1	-	-	-	+	-	-	-
302/15	2010	BW	Drainagesekret	OXA-48	629	100	11	-	15	1	-	-	-	+	-	-	-
303/15	2010	BE	Wundabstrich	OXA-48	391	554	11	-	15	1	1	-	-	+	-	-	-
304/15	2010	BB	zentraler Venenkatheter	OXA-48	101	137	1	-	15	1	1; 9	-	-	+	+	+	-
305/15	2010	BY	zentraler Venenkatheter	OXA-48	2254	85	77	-	15	-	1	-	-	+	-	-	-
307/15	2011	BE	Sputum	OXA-48	147	64	11	-	15	-	1	-	-	+	-	-	-
308/15	2011	BB	Urin	OXA-48	1399	43	11	-	15	1	1	-	-	+	+	-	+
309/15	2011	NW	Wundabstrich	OXA-48	101	137	1	-	15	1	1; 9	-	-	+	+	+	-
310/15	2011	BY	Trachealsekret	OXA-48	101	137	1	-	15	1	1	-	-	+	+	+	-
311/15	2011	BW	Wundabstrich	OXA-48	11	177	11	-	15	1	1	-	-	+	-	-	-
312/15	2011	SL	Peritonealabstrich	OXA-48	395	2	11	-	15	1	1	-	-	+	+	-	+
313/15	2011	RP	Urin	OXA-48	147	64	11	-	15	1	1	-	-	+	-	-	-
315/15	2012	BY	Trachealsekret	OXA-48	147	64	11	-	15	1	1	-	-	+ *	+	-	-
316/15	2012	BB	Trachealsekret	OXA-48	23	1	11	-	15	1	1	-	-	+	+	+	+
317/15	2012	BW	Wundabstrich	OXA-48	147	64	11	-	-	1	-	2	-	+	+	-	-
318/15	2012	SN	bronchoalveoläre Lavage	OXA-48	395	2	11	-	15	1	1	-	-	+	+	-	+
319/15	2012	SH	Nasenabstrich	OXA-48	101	137	1	-	15	-	-	-	-	+	+	+	-
321/15	2013	NW	Urin	OXA-48	101	137	1	-	15	1	1; 9	-	-	+	+	+	-
322/15	2013	SN	Rachenabstrich	OXA-48	101	137	1	-	14	1	9	-	-	+	+	+	-
323/15	2013	BY	Urin	OXA-48	147	12	11	-	15	1	-	-	-	+	+	-	-
324/15	2013	HH	Wundabstrich	OXA-48	1399	43	11	-	15	1	1	-	-	+	+	-	+
325/15	2013	BB	Bronchialsekret	OXA-48	1399	43	11	-	15	-	1	-	-	+	+	-	+
326/15	2013	HE	Urin	OXA-48	101	137	1	-	15	-	1	-	-	+	+	+	-
328/15	2014	NW	Rektalabstrich	OXA-48	906	508	-	16	-	-	-	-	-	+	-	+	-
329/15	2014	BY	Urin	OXA-48	17	555	11	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
330/15	2014	BW	Rachenabstrich	OXA-48	48	167	11	-	15	1	1	-	-	+	+	-	-

RKI-ID	Jahr	BL	Isolatquelle	Carbapenemase	ST	wzi	Beta-Laktamase-Gene							Virulenzfaktoren			
							<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{LEN}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{CMY}	<i>bla</i> _{VEB}	mrk	Yersiniabactin	kfu	Aerobactin
331/15	2014	HH	Pleurapunktat	OXA-48	15	24	28	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
332/15	2014	SN	Urin	OXA-48	101	137	1	-	14	1	9	-	-	+	+	+	-
334/15	2012	SH	Urin	NDM-1	15	552	28	-	15	1	1	-	-	+	-	+	-
336/15	2013	BY	Trachealsekret	NDM-1	16	50	1	-	15	1	-	-	-	+	+	-	-
338/15	2014	NW	Analabstrich	NDM-1	15	19	28	-	15	1	9	-	-	+	-	+	-
339/15	2014	BY	Analabstrich	NDM-1	147	64	11	-	15	-	-	-	-	+	+	-	-
340/15	2014	BE	Rektalabstrich	NDM-1	340	50	11	-	15	-	1	-	-	+	+	-	-
1134/16	2012	SN	Rektalabstrich	KPC-2	258	29	11	-	-	1	-	-	-	+	+	-	-
1135/16	2010	SN	Trachealsekret	KPC-2	258	29	11	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1136/16	2012	SN	Galle	KPC-2	258	29	11	-	-	1	-	-	-	+	+	-	-
1137/16	2011	SN	Vaginalabstrich	KPC-2	258	29	11	-	-	1	-	-	-	+	+	-	-
1138/16	2012	SN	Rektalabstrich	KPC-2	258	29	11	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
277/15	2011	HE	Rachenabstrich	KPC-2	258	29	11	-	-	1	-	-	-	+	+	-	-
333/15	2014	HE	zentraler Venenkatheter	OXA-48	307	173	28	-	15	1	-	-	-	+	-	-	-
222/09	2009	BE	Trachealsekret	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
241/09	2009	BE	Bronchialsekret	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
46/10	2010	BE	Trachealsekret	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
47/10	2010	BE	Urin	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
412- 1/11	2011	BE	keine Angabe	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
413/11	2011	BE	bronchoalveoläre Lavage	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
85/12	2012	BE	Trachealsekret	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
512/12	2012	BE	Trachealsekret	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
635/12	2012	BE	Urin	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
101/10	2010	BE	keine Angabe	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
10/11	2010	BE	Urin	KPC-3	512	154	-	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
237/13	2013	BE	keine Angabe	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-

RKI-ID	Jahr	BL	Isolatquelle	Carbapenemase	ST	wzi	Beta-Laktamase-Gene							Virulenzfaktoren			
							<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{LEN}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{CMY}	<i>bla</i> _{VEB}	mrk	Yersiniabactin	kfu	Aerobactin
260/13	2013	BE	Nasenabstrich	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
550/13	2013	BE	Rektalabstrich	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
119/10	2010	NI	Blutkultur	KPC-3	37	96	11	-	15	1	1	-	-	+	-	-	-
419/12	2012	BY	keine Angabe	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
14/11	2010	HE	keine Angabe	KPC-2	784	118	1	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
148/12	2013	HE	keine Angabe	KPC-2	258	29	11	-	-	1	-	-	-	+ *	-	-	-
86/09	2009	BB	Bronchialsekret	KPC-2	258	29	11	-	-	1	-	-	-	+ *	-	-	-
24/10	2009	BE	keine Angabe	KPC-2	258	29	11	-	-	1	-	-	-	+ *	-	-	-
234/11	2010	SN	keine Angabe	KPC-2	258	29	11	-	-	-	-	-	-	+ *	-	-	-
236/11	2011	SN	keine Angabe	KPC-2	258	29	11	-	-	-	-	-	-	+ *	-	-	-
341/12	2012	SN	Analabstrich	KPC-2	258	29	11	-	-	-	-	-	-	+ *	-	-	-
343/12	2012	SN	Wundabstrich	KPC-2	258	29	11	-	-	-	-	-	-	+ *	-	-	-
173/11	2011	BY	keine Angabe	KPC-2	258	29	11	-	-	1	-	-	-	+ *	+	-	-
536/13	2012	NI	Wundabstrich	KPC-2	147	64	11	-	-	1	-	-	1	+	-	-	-
319/11	2011	SA	Blutkultur	KPC-2	258	29	11	-	-	1	-	-	-	+ *	-	-	-
213/09	2009	NW	Rachenabstrich	KPC-2	258	29	11	-	-	1	-	-	-	+ *	+ ****	-	-
35/11	2011	BE	Urin	KPC-2	258	29	11	-	-	1	-	-	-	+ *	-	-	-
63/11	2011	HE	keine Angabe	KPC-2	258	29	11	-	-	1	-	-	-	+ *	-	-	-
229/09	2009	NW	Trachealsekret	OXA-48	147	64	11	-	15	1	-	-	-	+	+	-	-
16/10	2010	NW	keine Angabe	OXA-48	147	64	11	-	15	1	-	-	-	+	+	-	-
346/12	2012	BE	Urin	OXA-48	101	137	1	-	15	1	1; 9	-	-	+	+	+	-
830/12	2012	NW	keine Angabe	OXA-48	147	64	11	-	15	1	1	-	-	+	-	-	-
545/13	2013	BE	keine Angabe	OXA-48	101	137	1	-	15	1	1; 9	-	-	+ ***	+	+	-
467/13	2013	NI	Trachealsekret	OXA-48	101	137	1	-	15	1	1	-	-	+	+	+	-
249/13	2013	BE	Brusthöhle	OXA-48	101	137	1	-	14	1	9	-	-	+	+	+	-
107/13	2013	NI	keine Angabe	OXA-48	101	137	1	-	15	1	1; 9	-	-	+	+	+	-
108/13	2013	NI	keine Angabe	OXA-48	147	64	11	-	15	1	1	-	-	+	+	-	-

RKI-ID	Jahr	BL	Isolatquelle	Carbapenemase	ST	wzi	Beta-Laktamase-Gene							Virulenzfaktoren			
							<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{LEN}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{CMY}	<i>bla</i> _{VEB}	mrk	Yersiniabactin	kfu	Aerobactin
482/12	2013	BE	Urin	OXA-48	101	137	1	-	15	1	1	-	-	+	+	+	-
375/08	2008	HE	Blutkultur	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-
135/14	2012	BE	Bronchialsekret	OXA-48	101	137	1	-	14	1	9	-	-	+	+	+	-
137/14	2013	BE	Trachealsekret	OXA-48	15	24	28	-	15	1	1	-	-	+	+	+	-
140/14	2014	BE	Rektalabstrich	OXA-48	395	2	11	-	15	1	1	-	-	+	+	-	-
141/14	2013	BE	Blutkultur	KPC-3	512	154	11	-	-	1	-	-	-	+	-	-	-

Tabelle A 2 Ergebnisse der Plasmidfinder –Analyse für die Carbapenemase-produzierenden Isolate

RKI-ID	Carbapenemase	ST	Probe (NCBI Zugangsnummer)																							Replikons kleiner Plasmide (Carattoli et al., 2014)				
			IncA/C2 (JN157804)	IncFIA (HI1) (AF250878)	IncFIB(pQil) (JN233705)	IncFIB(K) (JN233704)	IncFIB(Mar) (JN420336)	IncFIB(pKPHS1) (CP003223)	IncFII (CP000966)	IncFII (AY458016)	IncFII(K) (CP000648)	IncFII(pKPX1)	IncFII(Yp) (CP000670)	IncHII B (JN420336)	IncL/M(pOXA-48) (JN626286)	IncL/M(pMU407) (U27345)	IncN (AY046276)	IncN2 (JF785549)	IncR (DQ449578)	IncU (DQ401103)	IncX3 (JN247852)	IncQ1 (HE654726)	IncQ2 (FJ696404)	ColRNAI (DQ298019)	Col(BS512) (NC_010656)	ColpVC (JX133088)	Col(MG828) (NC_008486)	Col(IMGS31) (NC_011406)	repA (JX397875)	
270/15	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-		
271/15	KPC-2	340	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
272/15	KPC-2	147	-	-	+	+	-	+	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
274/15	KPC-2	147	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
275/15	KPC-2	347	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
276/15	KPC-2	101	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
278/15	KPC-2	258	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
279/15	KPC-2	258	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-		
280/15	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-		
281/15	KPC-2	258	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-		
283/15	KPC-2	258	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-		
284/15	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-		
286/15	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
287/15	KPC-2	258	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-		
288/15	KPC-3	258	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
289/15	KPC-3	512	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-		
290/15	KPC-3	512	-	-	+	+	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-		
292/15	KPC-3	258	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
294/15	KPC-3	512	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-		
295/15	KPC-3	258	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-		

RKI-ID	Carbapenemase	ST	Probe (NCBI Zugangsnummer)																										
			Replikons kleiner Plasmide (Carattoli et al., 2014)																										
			IncA/C2 (JN157804)	IncFIA(HII) (AF250878)	IncFIB(pQil) (JN233705)	IncFIB(K) (JN233704)	IncFIB(Mar) (JN420336)	IncFIB(pKPHS1) (CP003223)	IncFII (CP000966)	IncFII (AY458016)	IncFII(K) (CP000648)	IncFII(pKFX1)	IncFII(Yp) (CP000670)	IncHIIB (JN420336)	IncL/M(pOXA-48) (JN626286)	IncL/M(pMU407) (U27345)	IncN (AY046276)	IncN2 (JF785549)	IncR (DQ449578)	IncU (DQ401103)	IncX3 (JN247852)	IncQ1 (HE654726)	IncQ2 (FJ696404)	ColRNAI (DQ298019)	Col(BS512) (NC_010656)	ColpVC (JX133088)	Col(MG828) (NC_008486)	Col(IMGS31) (NC_011406)	repA (JX397875)
297/15	KPC-3	258	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
299/15	KPC-3	512	-	-	+	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
301/15	OXA-48	16	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
302/15	OXA-48	629	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
303/15	OXA-48	391	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
304/15	OXA-48	101	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
305/15	OXA-48	2254	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
307/15	OXA-48	147	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
308/15	OXA-48	1399	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
309/15	OXA-48	101	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
310/15	OXA-48	101	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
311/15	OXA-48	11	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
312/15	OXA-48	395	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
313/15	OXA-48	147	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
315/15	OXA-48	147	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
316/15	OXA-48	23	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
317/15	OXA-48	147	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
318/15	OXA-48	395	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
319/15	OXA-48	101	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
321/15	OXA-48	101	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
322/15	OXA-48	101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

			Probe (NCBI Zugangsnummer)																										
			Replikons kleiner Plasmide (Carattoli et al., 2014)																										
RKI-ID	Carbapenemase	ST	IncA/C2 (JN157804)	IncFIA(HI1) (AF250878)	IncFIB(pQil) (JN233705)	IncFIB(K) (JN233704)	IncFIB(Mar) (JN420336)	IncFIB(pKPHS1) (CP003223)	IncFII (CP000966)	IncFII (AY458016)	IncFII(K) (CP000648)	IncFII(pKFX1)	IncFII(Yp) (CP000670)	IncHIIB	IncL/M(pOXA-48) (JN626286)	IncL/M(pMU407) (U27345)	IncN (AY046276)	IncN2 (JF785549)	IncR (DQ449578)	IncU (DQ401103)	IncX3 (JN247852)	IncQ1 (HE654726)	IncQ2 (FJ696404)	ColRNAI (DQ298019)	Col(BS512) (NC_010656)	ColpVC (JX133088)	Col(MG828) (NC_008486)	Col(IMGS31) (NC_011406)	repA (JX397875)
323/15	OXA-48	147	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
324/15	OXA-48	1399	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
325/15	OXA-48	1399	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
326/15	OXA-48	101	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
328/15	OXA-48	906	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
329/15	OXA-48	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
330/15	OXA-48	48	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
331/15	OXA-48	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
332/15	OXA-48	101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
334/15	NDM-1	15	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
336/15	NDM-1	16	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
338/15	NDM-1	15	-	-	+	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
339/15	NDM-1	147	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
340/15	NDM-1	340	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1134/16	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
1135/16	KPC-2	258	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
1136/16	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
1137/16	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
1138/16	KPC-2	258	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
277/15	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
333/15	OXA-48	307	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

RKI-ID	Carbapenemase	ST	Probe (NCBI Zugangsnummer)																								Replikons kleiner Plasmide (Carattoli et al., 2014)									
			IncA/C2 (JN157804)	IncFIA(HII) (AF250878)	IncFIB(pQil) (JN233705)	IncFIB(K) (JN233704)	IncFIB(Mar) (JN420336)	IncFIB(pKPHS1) (CP003223)	IncFII (CP000966)	IncFII (AY458016)	IncFII(K) (CP000648)	IncFII(pKFX1)	IncFII(Yp) (CP000670)	IncHIIB (JN420336)	IncL/M(pOXA-48) (JN626286)	IncL/M(pMU407) (U27345)	IncN (AY046276)	IncN2 (JF785549)	IncR (DQ449578)	IncU (DQ401103)	IncX3 (JN247852)	IncQ1 (HE654726)	IncQ2 (FJ696404)	ColRNAI (DQ298019)	Col(BS512) (NC_010656)	ColpVC (JX133088)	Col(MG828) (NC_008486)	Col(IMGS31) (NC_011406)	repA (JX397875)							
222/09	KPC-3	512	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-								
241/09	KPC-3	512	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-								
46/10	KPC-3	512	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-								
47/10	KPC-3	512	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-								
412-1/11	KPC-3	512	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-								
413/11	KPC-3	512	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-								
85/12	KPC-3	512	-	-	+	+	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-								
512/12	KPC-3	512	-	-	+	+	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-								
635/12	KPC-3	512	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-								
101/10	KPC-3	512	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-								
10/11	KPC-3	512	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
237/13	KPC-3	512	-	-	+	+	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-								
260/13	KPC-3	512	-	-	+	+	-	-	-	++	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-								
550/13	KPC-3	512	-	-	+	+	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-								
119/10	KPC-3	37	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
419/12	KPC-3	512	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-								
14/11	KPC-2	784	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
148/12	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-								
86/09	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-								
24/10	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-								
234/11	KPC-2	258	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-								

RKI-ID	Carbapenemase	ST	Probe (NCBI Zugangsnummer)																										
			Replikons kleiner Plasmide (Carattoli et al., 2014)																										
			IncA/C2 (JN157804)	IncFIA(HII) (AF250878)	IncFIB(pQil) (JN233705)	IncFIB(K) (JN233704)	IncFIB(Mar) (JN420336)	IncFIB(pKPHS1) (CP003223)	IncFII (CP000966)	IncFII (AY458016)	IncFII(K) (CP000648)	IncFII(pKFX1)	IncFII(Yp) (CP000670)	IncHIIB (JN420336)	IncL/M(pOXA-48) (JN626286)	IncL/M(pMU407) (U27345)	IncN (AY046276)	IncN2 (JF785549)	IncR (DQ449578)	IncU (DQ401103)	IncX3 (JN247852)	IncQ1 (HE654726)	IncQ2 (FJ696404)	ColRNAI (DQ298019)	Col(BS512) (NC_010656)	ColpVC (JX133088)	Col(MG828) (NC_008486)	Col(IMGS31) (NC_011406)	repA (JX397875)
236/11	KPC-2	258	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
341/12	KPC-2	258	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
343/12	KPC-2	258	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
173/11	KPC-2	258	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
536/13	KPC-2	147	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
319/11	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
213/09	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
35/11	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
63/11	KPC-2	258	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
229/09	OXA-48	147	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16/10	OXA-48	147	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
346/12	OXA-48	101	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
830/12	OXA-48	147	-	-	-	+	-	+	-	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
545/13	OXA-48	101	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
467/13	OXA-48	101	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
249/13	OXA-48	101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107/13	OXA-48	101	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108/13	OXA-48	147	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
482/12	OXA-48	101	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
375/08	KPC-3	512	-	-	+	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
135/14	OXA-48	101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

			Probe (NCBI Zugangsnummer)																			Replikons kleiner Plasmide (Carattoli et al., 2014)							
RKI-ID	Carbapenemase	ST	IncA/C2 (JN157804)	IncFIA(HII) (AF250878)	IncFIB(pQil) (JN233705)	IncFIB(K) (JN233704)	IncFIB(Mar) (JN420336)	IncFIB(pKPHS1) (CP003223)	IncFII (CP000966)	IncFII (AY458016)	IncFII(K) (CP000648)	IncFII(pKPX1)	IncFII(Yp) (CP000670)	IncHI1B (JN420336)	IncL/M(pOXA-48) (JN626286)	IncL/M(pMU407) (U27345)	IncN (AY046276)	IncN2 (JF785549)	IncR (DQ449578)	IncU (DQ401103)	IncX3 (JN247852)	IncQ1 (HE654726)	IncQ2 (FJ696404)	ColRNAI (DQ298019)	Col(BS512) (NC_010656)	ColIpVC (JX133088)	Col(MG828) (NC_008486)	Col(MMGS31) (NC_011406)	repA (JX397875)
137/14	OXA-48	15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
140/14	OXA-48	395	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
141/14	KPC-3	512	-	-	+	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

Replikons kleiner Plasmide
(Carattoli et al., 2014)

Tabelle A 3 Übersicht über die internationalen *K. pneumoniae*-Isolate, die in die phylogenetische Analyse eingeschlossen wurden.

Angegeben sind jeweils die Zugangsnummer unter der die verwendeten Sequenzen bei ENA bzw. NCBI zu finden sind, der Name des jeweiligen Isolats und soweit bekannt das Jahr der Isolation, der Herkunftsort, der Sequenztyp sowie für die Isolate der Sequenztypen ST258 und ST512 die produzierte Carbapenemase (für die anderen Isolate wurde der Gehalt an Carbapenemase-Genen nicht untersucht). Unter Referenz ist die Quelle angegeben, der die zuvor genannten Metadaten entnommen wurden (neben dem jeweiligen Genbank-Eintrag).

#	Zugangsnummer (ENA bzw. NCBI)	Name des Isolats	Jahr	Herkunft	MLST	Carbapenemase	Referenz
1	ERS005750	<i>K. pneumoniae</i> AJ033	2001	Australien	unbekannt	n.b.	(Holt et al., 2015)
2	ERS005751	<i>K. pneumoniae</i> AJ034	2001	Australien	1109	n.b.	(Holt et al., 2015)
3	ERS005742	<i>K. pneumoniae</i> AJ048	2001	Australien	1109	n.b.	(Holt et al., 2015)
4	ERS005743	<i>K. pneumoniae</i> AJ049	2001	Australien	30	n.b.	(Holt et al., 2015)
5	ERS005744	<i>K. pneumoniae</i> AJ054	2001	Australien	36	n.b.	(Holt et al., 2015)
6	ERS005745	<i>K. pneumoniae</i> AJ006	2001	Australien	2116	n.b.	(Holt et al., 2015)
7	ERS005749	<i>K. pneumoniae</i> AJ031	2001	Australien	747	n.b.	(Holt et al., 2015)
8	ERS005762	<i>K. pneumoniae</i> AJ094	2002	Australien	14	n.b.	(Holt et al., 2015)
9	ERS005763	<i>K. pneumoniae</i> AJ097	2002	Australien	14	n.b.	(Holt et al., 2015)
10	ERS005756	<i>K. pneumoniae</i> AJ146	2002	Australien	292	n.b.	(Holt et al., 2015)
11	ERS005755	<i>K. pneumoniae</i> AJ148	2002	Australien	20	n.b.	(Holt et al., 2015)
12	ERS005757	<i>K. pneumoniae</i> AJ056	2001	Australien	unbekannt	n.b.	(Holt et al., 2015)
13	ERS005758	<i>K. pneumoniae</i> AJ064	2001	Australien	unbekannt	n.b.	(Holt et al., 2015)
14	ERS005759	<i>K. pneumoniae</i> AJ082	2002	Australien	290	n.b.	(Holt et al., 2015)
15	ERS005760	<i>K. pneumoniae</i> AJ083	2002	Australien	20	n.b.	(Holt et al., 2015)
16	ERS005765	<i>K. pneumoniae</i> AJ155	2002	Australien	23	n.b.	(Holt et al., 2015)
17	ERS005774	<i>K. pneumoniae</i> AJ196	2002	Australien	310	n.b.	(Holt et al., 2015)
18	ERS005775	<i>K. pneumoniae</i> AJ205	2002	Australien	43	n.b.	(Holt et al., 2015)
19	ERS005766	<i>K. pneumoniae</i> AJ210	2002	Australien	66	n.b.	(Holt et al., 2015)
20	ERS005767	<i>K. pneumoniae</i> AJ211	2002	Australien	43	n.b.	(Holt et al., 2015)
21	ERS005768	<i>K. pneumoniae</i> AJ156	2002	Australien	750	n.b.	(Holt et al., 2015)
22	ERS005770	<i>K. pneumoniae</i> AJ158	2002	Australien	unbekannt	n.b.	(Holt et al., 2015)
23	ERS005772	<i>K. pneumoniae</i> AJ170	2002	Australien	37	n.b.	(Holt et al., 2015)
24	ERS005773	<i>K. pneumoniae</i> AJ188	2002	Australien	unbekannt	n.b.	(Holt et al., 2015)
25	ERS005777	<i>K. pneumoniae</i> AJ214	2002	Australien	2120	n.b.	(Holt et al., 2015)
26	ERS005786	<i>K. pneumoniae</i> AJ281	2002	Australien	152	n.b.	(Holt et al., 2015)
27	ERS005787	<i>K. pneumoniae</i> AJ289	2002	Australien	14	n.b.	(Holt et al., 2015)
28	ERS005779	<i>K. pneumoniae</i> AJ299	2002	Australien	753	n.b.	(Holt et al., 2015)
29	ERS005780	<i>K. pneumoniae</i> AJ303	2002	Australien	48	n.b.	(Holt et al., 2015)
30	ERS005781	<i>K. pneumoniae</i> AJ218	2002	Australien	184	n.b.	(Holt et al., 2015)
31	ERS005783	<i>K. pneumoniae</i> AJ229	2002	Australien	1777	n.b.	(Holt et al., 2015)
32	ERS005784	<i>K. pneumoniae</i> AJ256	2002	Australien	48	n.b.	(Holt et al., 2015)
33	ERS005785	<i>K. pneumoniae</i> AJ278	2002	Australien	200	n.b.	(Holt et al., 2015)
34	ERS011914	<i>K. pneumoniae</i> DM16912/02	2002	Singapur	23	n.b.	(Holt et al., 2015)
35	ERS011923	<i>K. pneumoniae</i> DU46543/08	2008	Singapur	2127	n.b.	(Holt et al., 2015)
36	ERS011915	<i>K. pneumoniae</i> DM17138/03	2003	Singapur	23	n.b.	(Holt et al., 2015)
37	ERS011916	<i>K. pneumoniae</i> DM17337/04	2004	Singapur	828	n.b.	(Holt et al., 2015)

#	Zugangsnummer (ENA bzw. NCBI)	Name des Isolats	Jahr	Herkunft	MLST	Carbapenemase	Referenz
38	ERS011917	<i>K. pneumoniae</i> DM11825/05	2005	Singapur	23	n.b.	(Holt et al., 2015)
39	ERS011918	<i>K. pneumoniae</i> DB270/04	2004	Singapur	48	n.b.	(Holt et al., 2015)
40	ERS011919	<i>K. pneumoniae</i> DU8882/04	2004	Singapur	359	n.b.	(Holt et al., 2015)
41	ERS011921	<i>K. pneumoniae</i> DX259/08	2008	Singapur	184	n.b.	(Holt et al., 2015)
42	ERS011949	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-771	2006	USA	754	n.b.	(Holt et al., 2015)
43	ERS011804	<i>K. pneumoniae</i> 08-1177m	2008	Vietnam	231	n.b.	(Holt et al., 2015)
44	ERS011805	<i>K. pneumoniae</i> UV937	2003	Vietnam	20	n.b.	(Holt et al., 2015)
45	ERS011797	<i>K. pneumoniae</i> 07-0003m	2007	Vietnam	23	n.b.	(Holt et al., 2015)
46	ERS011798	<i>K. pneumoniae</i> 09-0079m	2009	Vietnam	231	n.b.	(Holt et al., 2015)
47	ERS011799	<i>K. pneumoniae</i> 07-2034m	2007	Vietnam	23	n.b.	(Holt et al., 2015)
48	ERS011801	<i>K. pneumoniae</i> 08-475T	2009	Vietnam	23	n.b.	(Holt et al., 2015)
49	ERS011802	<i>K. pneumoniae</i> 08-058D	2008	Vietnam	231	n.b.	(Holt et al., 2015)
50	ERS011806	<i>K. pneumoniae</i> UV1172	2004	Vietnam	416	n.b.	(Holt et al., 2015)
51	ERS011816	<i>K. pneumoniae</i> K53N	2004	Vietnam	416	n.b.	(Holt et al., 2015)
52	ERS011817	<i>K. pneumoniae</i> K77An	2004	Vietnam	2054	n.b.	(Holt et al., 2015)
53	ERS011807	<i>K. pneumoniae</i> NCSR101	2007	Vietnam	11	n.b.	(Holt et al., 2015)
54	ERS011810	<i>K. pneumoniae</i> UV1625	2007	Vietnam	540	n.b.	(Holt et al., 2015)
55	ERS011811	<i>K. pneumoniae</i> UV1714	2007	Vietnam	2054	n.b.	(Holt et al., 2015)
56	ERS011813	<i>K. pneumoniae</i> K21Sp	2004	Vietnam	42	n.b.	(Holt et al., 2015)
57	ERS011814	<i>K. pneumoniae</i> K35N	2004	Vietnam	416	n.b.	(Holt et al., 2015)
58	ERS011839	<i>K. pneumoniae</i> B-013-I-a-2	2005	Vietnam	759	n.b.	(Holt et al., 2015)
59	ERS011833	<i>K. pneumoniae</i> K280N	2005	Vietnam	34	n.b.	(Holt et al., 2015)
60	ERS011834	<i>K. pneumoniae</i> K282Ax	2005	Vietnam	48	n.b.	(Holt et al., 2015)
61	ERS011835	<i>K. pneumoniae</i> K290N	2005	Vietnam	1	n.b.	(Holt et al., 2015)
62	ERS011836	<i>K. pneumoniae</i> K296N	2005	Vietnam	762	n.b.	(Holt et al., 2015)
63	ERS011837	<i>K. pneumoniae</i> K307An	2005	Vietnam	147	n.b.	(Holt et al., 2015)
64	ERS011838	<i>K. pneumoniae</i> A-003-I-a-1	2005	Vietnam	763	n.b.	(Holt et al., 2015)
65	ERS011842	<i>K. pneumoniae</i> D-026-I-b-1	2005	Vietnam	17	n.b.	(Holt et al., 2015)
66	ERS011851	<i>K. pneumoniae</i> EW-29-R-MAG	2006	Vietnam	764	n.b.	(Holt et al., 2015)
67	ERS011852	<i>K. pneumoniae</i> EW-33-R-MAC-2	2006	Vietnam	327	n.b.	(Holt et al., 2015)
68	ERS011853	<i>K. pneumoniae</i> EW-44-R-MAG-1	2006	Vietnam	2130	n.b.	(Holt et al., 2015)
69	ERS011843	<i>K. pneumoniae</i> 015-CN-2	2007	Vietnam	765	n.b.	(Holt et al., 2015)
70	ERS011849	<i>K. pneumoniae</i> EW-20-R-MAG-1	2006	Vietnam	768	n.b.	(Holt et al., 2015)
71	ERS011850	<i>K. pneumoniae</i> EW-20-R-MAC-1	2006	Vietnam	76	n.b.	(Holt et al., 2015)
72	ERS011863	<i>K. pneumoniae</i> Kp-Miami	2008	USA	769	n.b.	(Holt et al., 2015)
73	ERS011855	<i>K. pneumoniae</i> EW-67-R-MAC	2006	Vietnam	2132	n.b.	(Holt et al., 2015)
74	ERS011856	<i>K. pneumoniae</i> EW-68-R-MAC-1	2006	Vietnam	111	n.b.	(Holt et al., 2015)
75	ERS011857	<i>K. pneumoniae</i> EW-85-R-MAN	2006	Vietnam	36	n.b.	(Holt et al., 2015)
76	ERS011878	<i>K. pneumoniae</i> U 12567	2008	Laos	15	n.b.	(Holt et al., 2015)
77	ERS011888	<i>K. pneumoniae</i> UI 4650	unbekannt	Laos	25	n.b.	(Holt et al., 2015)
78	ERS011879	<i>K. pneumoniae</i> U 13792/2	2009	Laos	273	n.b.	(Holt et al., 2015)
79	ERS011880	<i>K. pneumoniae</i> U 16821	2009	Laos	530	n.b.	(Holt et al., 2015)
80	ERS011882	<i>K. pneumoniae</i> UI 522	2000	Laos	587	n.b.	(Holt et al., 2015)
81	ERS011883	<i>K. pneumoniae</i> UI 2213	2002	Laos	1948	n.b.	(Holt et al., 2015)

#	Zugangsnummer (ENA bzw. NCBI)	Name des Isolats	Jahr	Herkunft	MLST	Carbapenemase	Referenz
82	ERS011886	<i>K. pneumoniae</i> UI 3324	2003	Laos	1190	n.b.	(Holt et al., 2015)
83	ERS011902	<i>K. pneumoniae</i> DM23092/04	2004	Singapur	11	n.b.	(Holt et al., 2015)
84	ERS011911	<i>K. pneumoniae</i> DU38032/05	2005	Singapur	11	n.b.	(Holt et al., 2015)
85	ERS011912	<i>K. pneumoniae</i> DM1159/01	2001	Singapur	65	n.b.	(Holt et al., 2015)
86	ERS011913	<i>K. pneumoniae</i> DR19891/02	2002	Singapur	2039	n.b.	(Holt et al., 2015)
87	ERS011903	<i>K. pneumoniae</i> DB44834/96	1996	Singapur	42	n.b.	(Holt et al., 2015)
88	ERS011904	<i>K. pneumoniae</i> DU4033/04	2004	Singapur	11	n.b.	(Holt et al., 2015)
89	ERS011905	<i>K. pneumoniae</i> DB11802/05	2005	Singapur	17	n.b.	(Holt et al., 2015)
90	ERS011906	<i>K. pneumoniae</i> DR5092/05	2005	Singapur	11	n.b.	(Holt et al., 2015)
91	ERS011907	<i>K. pneumoniae</i> DU10252/04	2004	Singapur	11	n.b.	(Holt et al., 2015)
92	ERS011909	<i>K. pneumoniae</i> DU33062/05	2005	Singapur	15	n.b.	(Holt et al., 2015)
93	ERS011818	<i>K. pneumoniae</i> K86N	2004	Vietnam	42	n.b.	(Holt et al., 2015)
94	ERS011827	<i>K. pneumoniae</i> K261An	2005	Vietnam	399	n.b.	(Holt et al., 2015)
95	ERS011828	<i>K. pneumoniae</i> K262N	2005	Vietnam	17	n.b.	(Holt et al., 2015)
96	ERS011819	<i>K. pneumoniae</i> K102An	2004	Vietnam	14	n.b.	(Holt et al., 2015)
97	ERS011820	<i>K. pneumoniae</i> K113N	2004	Vietnam	540	n.b.	(Holt et al., 2015)
98	ERS011823	<i>K. pneumoniae</i> K228An	2005	Vietnam	1269	n.b.	(Holt et al., 2015)
99	ERS011824	<i>K. pneumoniae</i> K231An	2005	Vietnam	176	n.b.	(Holt et al., 2015)
100	ERS011826	<i>K. pneumoniae</i> K242An	2005	Vietnam	395	n.b.	(Holt et al., 2015)
101	ERS011866	<i>K. pneumoniae</i> AF 3927	2006	Laos	35	n.b.	(Holt et al., 2015)
102	ERS011867	<i>K. pneumoniae</i> Pus 4878	2007	Laos	791	n.b.	(Holt et al., 2015)
103	ERS011868	<i>K. pneumoniae</i> Pus 9314/2	2008	Laos	23	n.b.	(Holt et al., 2015)
104	ERS011869	<i>K. pneumoniae</i> LF 7160	2007	Laos	15	n.b.	(Holt et al., 2015)
105	ERS011871	<i>K. pneumoniae</i> Pus 15007	2009	Laos	133	n.b.	(Holt et al., 2015)
106	ERS011873	<i>K. pneumoniae</i> Pus 15987	2009	Laos	23	n.b.	(Holt et al., 2015)
107	ERS011900	<i>K. pneumoniae</i> UI 14245	unbekannt	Laos	749	n.b.	(Holt et al., 2015)
108	ERS011891	<i>K. pneumoniae</i> UI 6717	2005	Laos	17	n.b.	(Holt et al., 2015)
109	ERS011893	<i>K. pneumoniae</i> UI 8601	2006	Laos	2145	n.b.	(Holt et al., 2015)
110	ERS011895	<i>K. pneumoniae</i> UI 10871	2007	Laos	48	n.b.	(Holt et al., 2015)
111	ERS011897	<i>K. pneumoniae</i> ST 752	2008	Laos	15	n.b.	(Holt et al., 2015)
112	ERS011898	<i>K. pneumoniae</i> UI 12780	2008	Laos	25	n.b.	(Holt et al., 2015)
113	ERS011983	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-967	2007	USA	277	n.b.	(Holt et al., 2015)
114	ERS011984	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-968	2007	USA	278	n.b.	(Holt et al., 2015)
115	ERS011975	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-891	2007	USA	45	n.b.	(Holt et al., 2015)
116	ERS011976	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-892	2007	USA	252	n.b.	(Holt et al., 2015)
117	ERS011979	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-896	2007	USA	255	n.b.	(Holt et al., 2015)
118	ERS011980	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-963	2007	USA	275	n.b.	(Holt et al., 2015)
119	ERS011981	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-964	2007	USA	15	n.b.	(Holt et al., 2015)
120	ERS011982	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-965	2007	USA	276	n.b.	(Holt et al., 2015)
121	ERS011986	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-972	2007	USA	20	n.b.	(Holt et al., 2015)
122	ERS011987	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-974	2007	USA	280	n.b.	(Holt et al., 2015)
123	ERS011988	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-975	2007	USA	281	n.b.	(Holt et al., 2015)
124	ERS012002	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-776	2006	USA	239	n.b.	(Holt et al., 2015)
125	ERS012005	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-862	2006	USA	188	n.b.	(Holt et al., 2015)

#	Zugangsnummer (ENA bzw. NCBI)	Name des Isolats	Jahr	Herkunft	MLST	Carbapenemase	Referenz
126	ERS012020	<i>K. pneumoniae</i> 09-332B	2009	Vietnam	unbekannt	n.b.	(Holt et al., 2015)
127	ERS012021	<i>K. pneumoniae</i> 09-370B	2009	Vietnam	11	n.b.	(Holt et al., 2015)
128	ERS012011	<i>K. pneumoniae</i> 09-2503m	2009	Vietnam	592	n.b.	(Holt et al., 2015)
129	ERS012012	<i>K. pneumoniae</i> 09-400B	2009	Vietnam	111	n.b.	(Holt et al., 2015)
130	ERS012013	<i>K. pneumoniae</i> 09-406B	2009	Vietnam	231	n.b.	(Holt et al., 2015)
131	ERS012014	<i>K. pneumoniae</i> 09-2006m	2009	Vietnam	778	n.b.	(Holt et al., 2015)
132	ERS012017	<i>K. pneumoniae</i> 09-2072m	2009	Vietnam	unbekannt	n.b.	(Holt et al., 2015)
133	ERS012031	<i>K. pneumoniae</i> 805m	2009	Vietnam	86	n.b.	(Holt et al., 2015)
134	ERS012032	<i>K. pneumoniae</i> 1517	2005	Indonesien	107	n.b.	(Holt et al., 2015)
135	ERS012033	<i>K. pneumoniae</i> 1523	2005	Indonesien	unbekannt	n.b.	(Holt et al., 2015)
136	ERS012023	<i>K. pneumoniae</i> 09-341B	2009	Vietnam	147	n.b.	(Holt et al., 2015)
137	ERS012024	<i>K. pneumoniae</i> 09-2985m	2009	Vietnam	25	n.b.	(Holt et al., 2015)
138	ERS012027	<i>K. pneumoniae</i> 620m	2009	Vietnam	65	n.b.	(Holt et al., 2015)
139	ERS012029	<i>K. pneumoniae</i> 2358m	2008	Vietnam	23	n.b.	(Holt et al., 2015)
140	ERS012030	<i>K. pneumoniae</i> 558m	2009	Vietnam	660	n.b.	(Holt et al., 2015)
141	ERS012034	<i>K. pneumoniae</i> 1524	2005	Indonesien	unbekannt	n.b.	(Holt et al., 2015)
142	ERS012043	<i>K. pneumoniae</i> 1764	2005	Indonesien	43	n.b.	(Holt et al., 2015)
143	ERS012044	<i>K. pneumoniae</i> 1765	2005	Indonesien	43	n.b.	(Holt et al., 2015)
144	ERS012045	<i>K. pneumoniae</i> 1789	2005	Indonesien	unknown	n.b.	(Holt et al., 2015)
145	ERS012035	<i>K. pneumoniae</i> 1555	2005	Indonesien	43	n.b.	(Holt et al., 2015)
146	ERS012037	<i>K. pneumoniae</i> 1576	2005	Indonesien	495	n.b.	(Holt et al., 2015)
147	ERS012038	<i>K. pneumoniae</i> 1585	2005	Indonesien	unbekannt	n.b.	(Holt et al., 2015)
148	ERS012041	<i>K. pneumoniae</i> 1612	2005	Indonesien	36	n.b.	(Holt et al., 2015)
149	ERS012042	<i>K. pneumoniae</i> 1753	2005	Indonesien	43	n.b.	(Holt et al., 2015)
150	ERS011784	<i>K. pneumoniae</i> 08-049B	2008	Vietnam	23	n.b.	(Holt et al., 2015)
151	ERS011785	<i>K. pneumoniae</i> 71M	2008	Vietnam	unbekannt	n.b.	(Holt et al., 2015)
152	ERS011786	<i>K. pneumoniae</i> 08-0345m	2008	Vietnam	unbekannt	n.b.	(Holt et al., 2015)
153	ERS011788	<i>K. pneumoniae</i> 08-0116m	2008	Vietnam	unbekannt	n.b.	(Holt et al., 2015)
154	ERS011790	<i>K. pneumoniae</i> 71B	2007	Vietnam	656	n.b.	(Holt et al., 2015)
155	ERS011791	<i>K. pneumoniae</i> 09-286G	2009	Vietnam	499	n.b.	(Holt et al., 2015)
156	ERS011971	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-886	2007	USA	189	n.b.	(Holt et al., 2015)
157	ERS011972	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-887	2007	USA	249	n.b.	(Holt et al., 2015)
158	ERS011968	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-882	2007	USA	225	n.b.	(Holt et al., 2015)
159	ERS011969	<i>K. pneumoniae</i> QMP M1-884	2007	USA	247	n.b.	(Holt et al., 2015)
160	ERS012046	<i>K. pneumoniae</i> 1824	2005	Indonesien	780	n.b.	(Holt et al., 2015)
161	ERS012047	<i>K. pneumoniae</i> 1884	2005	Indonesien	709	n.b.	(Holt et al., 2015)
162	ERS012048	<i>K. pneumoniae</i> 1896	2005	Indonesien	unbekannt	n.b.	(Holt et al., 2015)
163	ERS012049	<i>K. pneumoniae</i> 1897	2005	Indonesien	20	n.b.	(Holt et al., 2015)
164	ERS012050	<i>K. pneumoniae</i> 1993	2005	Indonesien	482	n.b.	(Holt et al., 2015)
165	ERS012051	<i>K. pneumoniae</i> 2024	2005	Indonesien	1411	n.b.	(Holt et al., 2015)
166	ERS012053	<i>K. pneumoniae</i> 2033	2005	Indonesien	15	n.b.	(Holt et al., 2015)
167	ERS012054	<i>K. pneumoniae</i> 1522	2005	Indonesien	2110	n.b.	(Holt et al., 2015)
168	NC_012731.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> NTUH-K2044 DNA, complete genome	unbekannt	Taiwan	23	n.b.	(Holt et al., 2015)

#	Zugangsnummer (ENA bzw. NCBI)	Name des Isolats	Jahr	Herkunft	MLST	Carbapenemase	Referenz
169	NC_009648.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578, complete genome	1994	USA?	38	n.b.	(Holt et al., 2015)
170	NC_017540.1	<i>K. pneumoniae</i> KCTC 2242, complete genome	unbekannt	Südkorea	375	n.b.	(Holt et al., 2015)
171	NC_016845.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> HSI1286 chromosome, complete genome	2011	China	11	n.b.	(Holt et al., 2015; Liu et al., 2012)
172	NZ_CP007727.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KPNIH10, complete genome	2011	USA	258	KPC-3	(Conlan et al., 2014b; Holt et al., 2015)
173	NZ_CP008827.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KPNIH1, complete genome	2011	USA	258	KPC-3	(Conlan et al., 2014b; Holt et al., 2015)
174	NC_018522.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 1084, complete genome	2002	Taiwan	23	n.b.	(Holt et al., 2015; Lin et al., 2012)
175	NZ_CP006659.2	<i>K. pneumoniae</i> strain ATCC BAA-2146 chromosome 1, complete sequence	2010	USA	11	n.b.	(Hudson et al., 2014)
176	NZ_CP011980.1	<i>K. pneumoniae</i> 500_1420, complete genome	2012	USA	258	KPC-2	(Wright et al., 2014)
177	NZ_CP011989.1	<i>K. pneumoniae</i> UHKPC33, complete genome	2008	USA	258	KPC-2	(Wright et al., 2014)
178	NZ_CP011976.1	<i>K. pneumoniae</i> DMC1097, complete genome	2010	USA	258	KPC-3	(Wright et al., 2014)
179	NZ_CP011985.1	<i>K. pneumoniae</i> UHKPC07, complete genome	2007	USA	258	KPC-2	(Wright et al., 2014)
180	NC_022082.1	<i>K. pneumoniae</i> JM45, complete genome	2010	China?	11	n.b.	
181	NC_022566.1	<i>K. pneumoniae</i> CG43, complete genome	unbekannt	Taiwan	86	n.b.	(Bialek-Davenet et al., 2014b)
182	NZ_CP003999.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> Kp13, complete genome	2009	Brasilien	442	n.b.	(Ramos et al., 2014)
183	NZ_CP006918.1	<i>K. pneumoniae</i> 30684/NJST258_2, complete genome	2010	USA	258	KPC-3	(DeLeo et al., 2014)
184	NZ_CP006923.1	<i>K. pneumoniae</i> 30660/NJST258_1, complete genome	2010	USA	258	KPC-3	(DeLeo et al., 2014)
185	NZ_CP007731.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KPNIH27, complete genome	2012	USA	34		(Conlan et al., 2014b)
186	NZ_CP008797.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KPNIH24, complete genome	2012	USA	258	KPC-2	(Conlan et al., 2014b)
187	NZ_CP008831.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KPR0928, complete sequence	2012	USA	258	KPC-2	(Conlan et al., 2014b)
188	NZ_CP006798.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> PittNDM01, complete genome	2013	USA	14	n.b.	(Doi et al., 2014)
189	NZ_CP009114.1	<i>K. pneumoniae</i> strain blaNDM-1, complete genome	unbekannt	USA	395	n.b.	(Van Duin et al., 2014)
190	NZ_CP008929.1	<i>K. pneumoniae</i> strain PMK1, complete genome	2011	Nepal	15	n.b.	(Stoesser et al., 2014)
191	NZ_CP009771.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> strain KPNIH33, complete genome	2013	USA	258	KPC-3	(Conlan et al., 2014b)
192	NZ_CP009775.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> strain KPNIH32, complete genome	2013	USA	258	KPC-3	(Conlan et al., 2014b)
193	NZ_CP009461.1	<i>K. pneumoniae</i> strain XH209, complete genome	2013	China	17	n.b.	
194	NZ_CP009863.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> strain KPNIH29, complete genome	2013	USA	1518	n.b.	(Conlan et al., 2014b)
195	NZ_CP009872.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> strain KPNIH30, complete genome	2013	USA	258	KPC-2	(Conlan et al., 2014b)
196	NZ_CP009876.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> strain KPNIH31, complete genome	2013	USA	392	n.b.	(Conlan et al., 2014b)
197	NZ_CP010361.1	<i>K. pneumoniae</i> strain 32192, complete genome	2010	USA	258	KPC-2	NZ_CP010575.1
198	NZ_CP006738.1	<i>K. pneumoniae</i> HK787, complete genome	unbekannt	Taiwan?	86	n.b.	
199	NZ_CP010392.1	<i>K. pneumoniae</i> strain 34618, complete genome	2011	USA	258	KPC-2	NZ_CP010396.1
200	NZ_CP006722.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 1158, complete genome	2002	Taiwan	65	n.b.	
201	NC_021232.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> strain SB3432, complete genome	2004	Frankreich	67	n.b.	(Fevre et al., 2011)
202	NZ_CP011313.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> strain 234-12, complete genome	2011	Deutschland	514	n.b.	(Becker et al., 2015; Haller et al., 2015)
203	NZ_CP011578.1	<i>K. pneumoniae</i> strain CAV1392, complete genome	2011	USA	11	n.b.	
204	NZ_CP011624.1	<i>K. pneumoniae</i> strain CAV1344, complete genome	2010	USA	941	n.b.	
205	NZ_CP011647.1	<i>K. pneumoniae</i> strain CAV1596, complete genome	2012	USA	258	KPC-3	(Mathers et al., 2015b)

#	Zugangsnummer (ENA bzw. NCBI)	Name des Isolats	Jahr	Herkunft	MLST	Carbapenemase	Referenz
206	NZ_CP012753.1	<i>K. pneumoniae</i> strain KP617, complete genome	2013	Südkorea	14	n.b.	
207	NZ_LN824133.1	<i>K. pneumoniae</i> genome assembly MS6671.v1, chromosome : _Chr_Kpneumoniae_MS6671	2014	Vereinigte Arabische Emirate	147	n.b.	
208	NZ_CP012987.1	<i>K. pneumoniae</i> strain KpN01, complete genome	2013	Kanada	278	n.b.	
209	NZ_CP012992.1	<i>K. pneumoniae</i> strain KpN06, complete genome	2013	Kanada	278	n.b.	
210	NZ_CP013322.1	<i>K. pneumoniae</i> strain CAV1193, complete genome	2010	USA	941	n.b.	
211	NZ_CP012043.1	<i>K. pneumoniae</i> strain U25 genome	2010	Indien	14	n.b.	(Rafiq et al., 2016)
212	NZ_CP014004.1	<i>K.pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> strain NUHL24835, complete genome	2014	China	14	n.b.	
213	NZ_CP014010.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> strain RJF999, complete genome	2015	China	23	n.b.	
214	NZ_CP014008.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> strain RJF293, complete genome	2014	China	374	n.b.	
215	NZ_CP012743.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> strain TGH8, complete genome	2011	Griechenland	383	n.b.	(Sabirova et al., 2016)
216	NZ_CP012744.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> strain TGH10, complete genome	2013	Griechenland	383	n.b.	(Sabirova et al., 2016)
217	NZ_CP015500.1	<i>K. pneumoniae</i> strain SKGH01, complete genome	2015	Vereinigte Arabische Emirate	147	n.b.	
218	NZ_CP015753.1	<i>K. pneumoniae</i> strain W14, complete genome	2014	China	1536	n.b.	
219	NZ_CP014755.1	<i>K. pneumoniae</i> strain AATZP, complete genome	2014	USA	147	n.b.	
220	NZ_CP015990.1	<i>K. pneumoniae</i> strain BR, complete genome	2015	China	15	n.b.	
221	NZ_CP014762.1	<i>K. pneumoniae</i> strain KPNIH39, complete genome	2014	USA	37	n.b.	
222	NZ_CP015025.1	<i>K. pneumoniae</i> strain Kpn223, complete genome	2013	USA	273	n.b.	
223	NZ_CP015130.1	<i>K. pneumoniae</i> strain Kpn555, complete genome	2014	USA	unbekannt	n.b.	
224	NZ_CP014647.1	<i>K. pneumoniae</i> strain KPNIH36, complete genome	2013	USA	258	KPC-3	NZ_CP014650.1
225	NZ_CP016159.1	<i>K. pneumoniae</i> strain TH1, complete genome	2014	China	1536	n.b.	
226	NZ_CP015822.1	<i>K. pneumoniae</i> isolate blood sample 2, complete genome	2010	Schweiz	512	KPC-3	NZ_CP015824.1
227	NZ_CP016814.1	<i>K. pneumoniae</i> strain ED23, complete genome	2006	Taiwan	23	n.b.	
228	NZ_CP016813.1	<i>K. pneumoniae</i> strain ED2, complete genome	2006	Taiwan	23	n.b.	
229	NZ_CP016923.1	<i>K. pneumoniae</i> isolate 11, complete genome	2013	USA	14	n.b.	
230	NZ_CP016926.1	<i>K. pneumoniae</i> isolate 23, complete genome	2014	USA	14	n.b.	
231	NZ_CP012560.1	<i>K. pneumoniae</i> strain UCLAOXA232KP_Pt0, complete genome	2014	USA	16	n.b.	
232	NZ_CP012568.1	<i>K. pneumoniae</i> strain UCLAOXA232KP, complete genome	2015	USA	16	n.b.	
233	NZ_CP012561.1	<i>K. pneumoniae</i> strain UCLAOXA232KP, complete genome	2014	USA	16	n.b.	
234	NZ_CP012745.1	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> strain TGH13, complete genome	2013	Griechenland	147	n.b.	
235	NZ_CP017385.1	<i>K. pneumoniae</i> strain KP36, complete genome	2007	Taiwan	15	n.b.	
236	NZ_CP012426.1	<i>K. pneumoniae</i> strain KP5, complete genome	2014	Singapur	147	n.b.	
237	NZ_CP017934.1	<i>K. pneumoniae</i> strain CAV1016, complete genome	2007	USA	45	n.b.	
238	NZ_CP018140.1	<i>K. pneumoniae</i> strain Kp_Goe_822579, complete genome	2013	Deutschland	147	n.b.	

Tabelle A 4 Übersicht über die im Rahmen der Ausbruchsanalyse sequenzierten Isolate

RKI-ID: RKI-interne Isolatnummer; Isolationsdatum: Zeitpunkt, zum dem das sequenzierte Isolat abgenommen wurde; Material: Patientenmaterial, aus dem das Isolat kultiviert wurde; MLST: Sequenztyp; *wzi*: Ergebnis der Kapseltypisierung über Bestimmung des *wzi*-Allels, Cluster WGS: Clusterzuordnung gemäß Ganzgenom-Analyse; PFGE-Typ: Klassifizierung basierend auf der vom NRZ durchgeführten PFGE-Analyse (n.b.: nicht bestimmt); Multiplex PCR: Ergebnis der Cluster 1-spezifischen PCR (positiv: alle drei Banden vorhanden, positiv*: PCR-Produkt der 4,160 kb-Primer fehlt, negativ: kein PCR-Produkt oder nur Amplifikation des hem-F/-R-Produkts); Veränderungen der Poringene: Ergebnis der Sequenzanalyse der Poringene *ompK35* und *ompK36* (+: Gen intakt, IS: Insertion einer Transposase, Stopp: vorzeitiges Stoppcodon in Klammern: Details zur Mutation); Beta-Laktamase-Gene: Beta-Laktamase-Gene, die in den Ganzgenom-Daten identifiziert wurden

#	RKI-ID	Isolationsdatum	Material	MLST	<i>wzi</i>	Cluster WGS	PFGE-Typ	Multiplex PCR	Veränderungen der Porin-Gene		Beta-Laktamase-Gene				
									<i>ompK35</i>	<i>ompK36</i>	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{OXa}	<i>bla</i> _{OKP-B}
1	652/15	12.06.2015	Trachealsekret	ST15	93	1	n.b.	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
2	653/15	13.06.2015	Rachenabstrich	ST101	137	-	n.b.	negativ	Stopp (C184-)	+	1A	15	1	1; 9-like	-
3	654/15	18.06.2015	Urinkatheter	ST15	93	1	n.b.	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
4	655/15	29.07.2015	Urinkatheter	ST15	93	1	n.b.	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
5	656/15	19.06.2015	Trachealsekret	ST37	83	-	n.b.	negativ	+	+	-	14	11	-	-
6	657/15	04.06.2015	Nasenabstrich	ST15	93	1	n.b.	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
7	658/15	09.07.2015	Trachealsekret	ST15	93	1	n.b.	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
8	659/15	12.06.2015	Urinkatheter	ST15	93	1	n.b.	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
9	660/15	08.09.2015	Rektalabstrich	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
10	661/15	12.06.2015	Nasenabstrich	ST15	93	1	n.b.	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
11	662/15	19.08.2015	Trachealsekret	ST15	93	1	1b	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
12	663/15	10.09.2015	Rektalabstrich	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
13	665/15	18.06.2015	Trachealsekret	ST15	93	1	n.b.	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
14	667/15	31.05.2015	Urinkatheter	ST15	93	1	1c	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
15	668/15	21.07.2015	Urinkatheter	ST15	93	1	n.b.	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
16	669/15	04.06.2015	Urinkatheter	ST15	93	1	n.b.	positiv	+	+	-	15	28	-	-
17	670/15	27.08.2015	Urinkatheter	ST48	62	-	4b	negativ	+	+	1B	15; 27	1	1	-
18	671/15	14.09.2015	Urinkatheter	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	-	15	28	-	-

#	RKI-ID	Isolationsdatum	Material	MLST	wzi	Cluster WGS	PFGE-Typ	Multiplex PCR	Veränderungen der Porin-Gene		Beta-Laktamase-Gene				
									ompk35	ompk36	bla _{TEM}	bla _{CTX-M}	bla _{SHV}	bla _{OXA}	bla _{OKP-B}
19	672/15	02.07.2015	Trachealsekret	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
20	673/15	15.09.2015	Trachealsekret	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
21	674/15	17.09.2015	Urin	ST414	44	3	3a	negativ	+	+	-	15	-	-	8
22	675/15	14.09.2015	Rektalabstrich	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
23	676/15	15.09.2015	Rektalabstrich	ST414	44	3	3a	negativ	+	+	-	15	-	-	8
24	677/15	22.09.2015	Rektalabstrich	ST15	93	1	1d	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
25	678/15	23.09.2015	Rektalabstrich	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	-	15	28	534	-
26	679/15	29.09.2015	Rektalabstrich	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
27	680/15	29.09.2015	Rektalabstrich	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
28	681/15	30.09.2015	Rektalabstrich	ST414	44	3	3a	negativ	+	+	-	15	-	-	8
29	682/15	29.09.2015	Rektalabstrich	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
30	683/15	06.10.2015	Trachealsekret	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
31	684/15	13.10.2015	Trachealsekret	ST15	93	1	1a	positiv*	IS	Stopp (C194-)	1B	15	28	-	-
32	666/15	13.10.2015	Trachealsekret	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	-	15	28	534	-
33	54/16	29.10.2015	Urin	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
34	55/16	09.11.2015	Rektalabstrich	ST405	143	2	2a	negativ	Stopp (G947A)	+	1B	15	76	-	-
35	56/16	09.11.2015	Rektalabstrich	ST405	143	2	2a	negativ	+	+	1B	15	76	-	-
36	57/16	09.11.2015	Rektalabstrich	ST405	143	2	2a	negativ	+	+	1B	15	76	-	-
37	58/16	11.11.2015	unbekannt	ST405	143	2	2a	negativ	+	+	1B	15	76	-	-
38	59/16	18.12.2015	Urin	ST405	143	2	2a	negativ	+	+	1B	15	76	-	-
39	377/16	07.07.2015	Trachealsekret	ST15	93	1	n.b.	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
40	378/16	17.07.2015	Trachealsekret	ST2382	280	-	5a	negativ	+	Stopp (-227C & -228C)	-	1	196	-	-

#	RKI-ID	Isolationsdatum	Material	MLST	wzi	Cluster WGS	PFGE-Typ	Multiplex PCR	Veränderungen der Porin-Gene		Beta-Laktamase-Gene				
									<i>ompk35</i>	<i>ompk36</i>	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{OKP-B}
41	379/16	27.06.2015	Trachealsekret	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
42	380/16	26.06.2015	Trachealsekret	ST15	93	1	1a	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
43	381/16	01.02.2016	Rektalabstrich	ST405	143	2	2a	negativ	+	+	1B	15	76	-	-
44	382/16	18.12.2015	Urin	ST15	24	-	6a	negativ	+	+	-	15	28	1	-
45	383/16	11.01.2016	Rachenabstrich	ST29	85	-	7a	negativ	+	+	1B	15	83	1	-
46	384/16	10.02.2016	Rektalabstrich	ST15	93	1	1e/f	positiv	+	+	1B	15	28	534	-
47	385/16	09.03.2016	Rektalabstrich	ST405	143	2	2a	negativ	+	+	1B	15	76	-	-
48	386/16	16.03.2016	Rektalabstrich	ST414	44	3	3a	negativ	+	+	-	15	-	-	8
49	388/16	07.04.2016	Trachealsekret	ST14	2	-	8a	negativ	+	+	1B	15	28	1	-
50	389/16	10.04.2016	Rektalabstrich	ST414	44	3	3a	negativ	+	+	-	15	-	-	8
51	390/16	10.04.2016	Rektalabstrich	ST414	44	3	3a	negativ	+	+	-	15	-	-	8
52	391/16	10.04.2016	Rektalabstrich	ST414	44	3	3a	negativ	+	+	-	15	-	-	8
53	392/16	11.04.2016	Rektalabstrich	ST414	44	3	3a	negativ	+	+	-	15	-	-	8

Tabelle A 5 Phänotypische Resistenzdaten ausgewählter Isolate aus dem Ausbruchsgeschehen

Angegeben sind die über Vitek bzw. Etest bestimmten MHK-Werte. Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Einteilung in sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R) nach den EUCAST-Richtlinien (Version v 6.0). Die Isolate 652/16, 662/15, 666/15, 680/15 gehören zum Cluster 1 (ST15). Isolat 684/15 gehört ebenfalls zum Cluster 1 und stammt vom selben Patienten wie das Isolat 680/15. Es trägt ein vorzeitiges Stoppcodon in *ompK36* und weist die Insertion eines Transposasegens in *ompK35* auf. Isolat 675/15 gehört zum Cluster 1 (ST15) und besitzt ein vorzeitiges Stoppcodon im *mgrB*-Gen. Isolat 59/16 gehört zum Cluster 2 (ST405). Isolat 55/16 gehört zum Cluster 2 (ST405) und besitzt ein vorzeitiges Stoppcodon im *ompK35*-Gen. Isolat 674/15 gehört zu Cluster 3 (ST414). Isolat 653/16 ist ein Einzelisolat (ST101) und besitzt ein vorzeitiges Stoppcodon im *ompK35*-Gen. Isolat 378/16 ist ein Einzelisolat (ST2382) mit einem vorzeitigen Stoppcodon im *ompK36*-Gen.

Abkürzungen: PIP, Piperacillin; TZP, Piperacillin-Tazobactam; CTX, Cefotaxim; CAZ, Ceftazidim; FEP, Cefepim; ATM, Aztreonam; IPM, Imipenem; MEM, Meropenem; AMK, Amikacin; GEN, Gentamicin; TOB, Tobramycin; CIP, Ciprofloxacin; MXF, Moxifloxacin; TGC, Tigecyclin; FOF, Fosfomycin; CST, Colistin; SXT, Trimethoprim-Sulfomathoxazol; ETP, Ertapenem

RKI-ID (Cluster)	Vitek																	Etest			
	PIP	TZP	CTX	CAZ	FEP	ATM	IPM	MEM	AMK	GEN	TOB	CIP	MXF	TGC	FOF	CST	SXT	IPM	ETP	MEM	CST
652/16 (1)	>64 (R)	32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≤2 (S)	≤1 (S)	>8 (R)	>2 (R)	>4 (R)	≤0,5 (S)	≤16 (S)	≤0,5 (S)	>160 (R)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
662/15 (1)	>64 (R)	16 (I)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	4 (S)	≤1 (S)	>8 (R)	>2 (R)	>4 (R)	≤0,5 (S)	≤16 (S)	≤0,5 (S)	>160 (R)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
666/15 (1)	>64 (R)	8 (S)	>32 (R)	16 (R)	>32 (R)	>32 (R)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	4 (S)	≤1 (S)	>8 (R)	>2 (R)	>4 (R)	≤0,5 (S)	≤16 (S)	≤0,5 (S)	40 (S)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
680/15 (1)	>64 (R)	32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≤2 (S)	≤1 (S)	8 (R)	>2 (R)	>4 (R)	1 (S)	128 (R)	≤0,5 (S)	>160 (R)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
684/15 (1)	>64 (R)	>64 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	2 (S)	8 (I)	≤2 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	>2 (R)	>4 (R)	≤0,5 (S)	>128 (R)	≤0,5 (S)	≤20 (S)	3 (I)	>32 (R)	4-6 (I)	n.b.
675/15 (1)	>64 (R)	32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	8 (S)	≤1 (S)	>8 (R)	>2 (R)	>4 (R)	2 (I)	≤16 (S)	>8 (R)	>160 (R)	n.b.	n.b.	n.b.	16-24 (R)
59/16 (2)	>64 (R)	≤4 (S)	>32 (R)	16 (R)	32 (R)	>32 (R)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≤2 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	≤0,25 (S)	2 (R)	≤0,5 (S)	≤16 (S)	≤0,5 (S)	>160 (R)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
55/16 (2)	>64 (R)	16 (I)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≤2 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	0,5 (S)	2 (R)	1 (S)	≤16 (S)	≤0,5 (S)	>160 (R)	0,125 (S)	0,094 (S)	0,023 (S)	n.b.
674/15 (3)	>64 (R)	≤4 (S)	>32 (R)	8 (R)	2 (I)	16 (R)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≤2 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	1 (I)	4 (R)	1 (S)	32 (S)	≤0,5 (S)	>160 (R)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
653/16 (-)	>64 (R)	>64 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	≤0,25 (S)	1 (S)	16 (I)	>8 (R)	>8 (R)	>2 (R)	>4 (R)	2 (I)	≤16 (S)	≤0,5 (S)	>160 (R)	0,125 (S)	1 (I)	3 (I)	n.b.
378/16 (-)	>64 (R)	8 (S)	>32 (R)	4 (I)	>32 (R)	>32 (R)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≤2 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	≤0,5 (S)	≤16 (S)	≤0,5 (S)	≤20 (S)	0,38 (S)	0,38 (S)	0,38 (S)	n.b.

Tabelle A 6 Liste der *K. pneumoniae*-Isolate, die verwendet wurden, um die Spezifität der Cluster 1-spezifischen PCR zu testen

	RKI-ID	Isolationsjahr	Bundesland	Isolatquelle	MLST	Beta-Laktamase-Gen
A	1/15	2015	Niedersachsen	Bronchialsekret	14	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
B	577/15	2015	Niedersachsen	Urin	1263	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
C	80/16	2016	Thüringen	Rektalabstrich	307	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
D	4/16	2016	Hessen	Wundabstrich	395	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
E	19/16	2016	Sachsen	Stuhlprobe	1192	<i>bla</i> _{CTX-M-3}
F	429/13	2011	Berlin	Rektalabstrich	15	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
G	446/13	2013	Berlin	Rektalabstrich	405	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
H	441/13	2012	Berlin	Rektalabstrich	29	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
I	421/13	2011	Berlin	Wundabstrich	1399	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
J	233/14	2011	Berlin	Wundabstrich	716	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
K	276/15	2011	Niedersachsen	Drainagesekret	101	<i>bla</i> _{KPC-2}
L	294/15	2012	Nordrhein-Westfalen	Sputum	512	<i>bla</i> _{KPC-3}
M	301/15	2010	Hessen	Urin	16	<i>bla</i> _{OXA-48}
N	308/15	2011	Brandenburg	Urin	1399	<i>bla</i> _{OXA-48}
O	316/15	2012	Brandenburg	Trachealsekret	23	<i>bla</i> _{OXA-48}
P	318/15	2012	Sachsen	Bronchoalveoläre Lavage	395	<i>bla</i> _{OXA-48}
Q	336/15	2013	Bayern	Trachealsekret	16	<i>bla</i> _{NDM-1}
R	311/15	2011	Rheinland-Pfalz	Wundabstrich	11	<i>bla</i> _{OXA-48}
S	338/15	2014	Nordrhein-Westfalen	Analabstrich	15	<i>bla</i> _{NDM-1}
T	331/15	2014	Hamburg	Pleurapunktat	15	<i>bla</i> _{OXA-48}

Tabelle A 7 Zugangsnummern zu den Miseq-Rohdaten aus dem Extraktionsvergleich

RKI-ID	<i>Sample unique name</i> (= <i>Library-Nummer</i>)	<i>Sample accession</i>	<i>Secondary accession</i>
234/12	Lib-316-234-12-GT	SAMEA3539006	ERS846155
234/12	Lib-319-234-12-MA	SAMEA3539007	ERS846156
234/12	Lib-322-234-12-MP	SAMEA3539008	ERS846157
234/12	Lib-325-234-12-GW	SAMEA3539009	ERS846158
234/12	Lib-328-234-12-DN	SAMEA3539010	ERS846159
234/12	Lib-331-234-12-DNM	SAMEA3539011	ERS846160
234/12	336-234-12-GT	SAMEA3539012	ERS846161
234/12	339-234-12-MA	SAMEA3539013	ERS846162
234/12	342-234-12-MP	SAMEA3539014	ERS846163
234/12	345-234-12-GW	SAMEA3539015	ERS846164
234/12	348-234-12-DN	SAMEA3539016	ERS846165
234/12	354-234-12-DNM	SAMEA3539017	ERS846166
234/12	Lib-359-234-12-MA	SAMEA3539018	ERS846167
234/12	Lib-362-234-12-MP	SAMEA3539019	ERS846168
234/12	Lib-365-234-12-GW	SAMEA3539020	ERS846169
234/12	Lib-374-234-12-GT	SAMEA3539021	ERS846170
234/12	789-234-12DNneu	SAMEA3539022	ERS846171
234/12	792-234-12DNMneu	SAMEA3539023	ERS846172

Tabelle A 8 Zugangsnummern zu den Miseq-Rohdaten der Carbapenemase-produzierenden Isolate

RKI-ID	<i>Sample unique name</i> (= <i>Library-Nummer</i>)	<i>Sample accession</i>	<i>Secondary accession</i>
270/15	1092	ERS1477056	SAMEA29206168
271/15	RKI-KP1	ERS1477057	SAMEA29206918
272/15	1094	ERS1477058	SAMEA29207668
274/15	1095	ERS1477059	SAMEA29208418
275/15	1096	ERS1477060	SAMEA29209168
276/15	1097	ERS1477061	SAMEA29209918
278/15	1098	ERS1477062	SAMEA29210668
279/15	1099	ERS1477063	SAMEA29211418
280/15	1100	ERS1477064	SAMEA29212168
281/15	1101	ERS1477065	SAMEA29212918
283/15	1102	ERS1477066	SAMEA29213668
284/15	RKI-KP-2	ERS1477067	SAMEA29214418
286/15	1104	ERS1477068	SAMEA29215168
287/15	1105	ERS1477069	SAMEA29215918
288/15	1106	ERS1477070	SAMEA29216668
289/15	1107	ERS1477071	SAMEA29217418
290/15	1108	ERS1477072	SAMEA29218168
292/15	1109	ERS1477073	SAMEA29218918
294/15	1110	ERS1477074	SAMEA29219668
295/15	1111	ERS1477075	SAMEA29220418
297/15	1112	ERS1477076	SAMEA29221168
299/15	1113	ERS1477077	SAMEA29221918
301/15	1923	ERS1477078	SAMEA29222668
302/15	1115	ERS1477079	SAMEA29223418
303/15	1116	ERS1477080	SAMEA29224168
304/15	1117	ERS1477081	SAMEA29224918

RKI-ID	<i>Sample unique name</i> (= <i>Library-Nummer</i>)	<i>Sample accession</i>	<i>Secondary accession</i>
305/15	1118	ERS1477082	SAMEA29225668
307/15	1119	ERS1477083	SAMEA29226418
308/15	1120	ERS1477084	SAMEA29227168
309/15	1121	ERS1477085	SAMEA29227918
310/15	1122	ERS1477086	SAMEA29228668
311/15	1123	ERS1477087	SAMEA29229418
312/15	1124	ERS1477088	SAMEA29230168
313/15	1125	ERS1477089	SAMEA29230918
315/15	1126	ERS1477090	SAMEA29231668
316/15	1127	ERS1477091	SAMEA29232418
317/15	1128	ERS1477092	SAMEA29233168
318/15	1129	ERS1477093	SAMEA29233918
319/15	1130	ERS1477094	SAMEA29234668
321/15	1131	ERS1477095	SAMEA29235418
322/15	1132	ERS1477096	SAMEA29236168
323/15	1133	ERS1477097	SAMEA29236918
324/15	1134	ERS1477098	SAMEA29237668
325/15	1135	ERS1477099	SAMEA29238418
326/15	1136	ERS1477100	SAMEA29239168
328/15	1137	ERS1477101	SAMEA29239918
329/15	1138	ERS1477102	SAMEA29240668
330/15	1924	ERS1477103	SAMEA29241418
331/15	1140	ERS1477104	SAMEA29242168
332/15	1141	ERS1477105	SAMEA29242918
334/15	1142	ERS1477106	SAMEA29243668
336/15	1143	ERS1477107	SAMEA29244418
338/15	1144	ERS1477108	SAMEA29245168
339/15	1145	ERS1477109	SAMEA29245918
340/15	1146	ERS1477110	SAMEA29246668
1134/16	1147	ERS1477111	SAMEA29247418
1135/16	1148	ERS1477112	SAMEA29248168
1136/16	1149	ERS1477113	SAMEA29248918
1137/16	1150	ERS1477114	SAMEA29249668
1138/16	1151	ERS1477115	SAMEA29250418
277/15	1920	ERS1477116	SAMEA29251168
333/15	1921	ERS1477117	SAMEA29251918
222/09	215	ERS1477118	SAMEA29252668
241/09	216	ERS1477119	SAMEA29253418
46/10	219	ERS1477120	SAMEA29254168
47/10	220	ERS1477121	SAMEA29254918
412-1/11	221	ERS1477122	SAMEA29255668
413/11	222	ERS1477123	SAMEA29256418
85/12	223	ERS1477124	SAMEA29257168
512/12	224	ERS1477125	SAMEA29257918
635/12	225	ERS1477126	SAMEA29258668
101/10	226	ERS1477127	SAMEA29259418
10/11	227	ERS1477128	SAMEA29260168
237/13	1919	ERS1477129	SAMEA29260918
260/13	229	ERS1477130	SAMEA29261668
550/13	230	ERS1477131	SAMEA29262418
119/10	1922	ERS1477132	SAMEA29263168

RKI-ID	<i>Sample unique name</i> (= <i>Library-Nummer</i>)	<i>Sample accession</i>	<i>Secondary accession</i>
419/12	234	ERS1477133	SAMEA29263918
14/11	235	ERS1477134	SAMEA29264668
148/12	236	ERS1477135	SAMEA29265418
86/09	237	ERS1477136	SAMEA29266168
24/10	238	ERS1477137	SAMEA29266918
234/11	240	ERS1477138	SAMEA29267668
236/11	241	ERS1477139	SAMEA29268418
341/12	242	ERS1477140	SAMEA29269168
343/12	243	ERS1477141	SAMEA29269918
173/11	244	ERS1477142	SAMEA29270668
536/13	245	ERS1477143	SAMEA29271418
319/11	246	ERS1477144	SAMEA29272168
213/09	247	ERS1477145	SAMEA29272918
35/11	248	ERS1477146	SAMEA29273668
63/11	249	ERS1477147	SAMEA29274418
229/09	250	ERS1477148	SAMEA29275168
16/10	251	ERS1477149	SAMEA29275918
346/12	252	ERS1477150	SAMEA29276668
830/12	253	ERS1477151	SAMEA29277418
545/13	254	ERS1477152	SAMEA29278168
467/13	255	ERS1477153	SAMEA29278918
249/13	256	ERS1477154	SAMEA29279668
107/13	257	ERS1477155	SAMEA29280418
108/13	258	ERS1477156	SAMEA29281168
482/12	259	ERS1477157	SAMEA29281918
375/08	260	ERS1477158	SAMEA29282668
135/14	393	ERS1477159	SAMEA29283418
137/14	394	ERS1477160	SAMEA29284168
140/14	395	ERS1477161	SAMEA29284918
141/14	396	ERS1477162	SAMEA29285668

Tabelle A 9 Zugangsnummern zu den Miseq-Rohdaten der im Rahmen der Ausbruchsanalyse sequenzierten Isolate

RKI-ID	<i>Sample unique name</i> (= <i>Library-Nummer</i>)	<i>Sample accession</i>	<i>Secondary accession</i>
662/15	1303	ERS1456836	SAMEA4557657
54/16	Lib-1649	ERS1456837	SAMEA4557658
55/16	Lib-1650	ERS1456838	SAMEA4557659
56/16	Lib-1651	ERS1456839	SAMEA4557660
57/16	Lib-1652	ERS1456840	SAMEA4557661
58/16	Lib-1653	ERS1456841	SAMEA4557662
59/16	Lib-1654	ERS1456842	SAMEA4557663
377/16	2301	ERS1456843	SAMEA4557664
378/16	2302	ERS1456844	SAMEA4557665
379/16	2303	ERS1456845	SAMEA4557666
380/16	2304	ERS1456846	SAMEA4557667
381/16	2305	ERS1456847	SAMEA4557668
382/16	2306	ERS1456848	SAMEA4557669
383/16	2307	ERS1456849	SAMEA4557670

RKI-ID	<i>Sample unique name (= Library-Nummer)</i>	<i>Sample accession</i>	<i>Secondary accession</i>
384/16	2308	ERS1456850	SAMEA4557671
385/16	2309	ERS1456851	SAMEA4557672
386/16	2310	ERS1456852	SAMEA4557673
388/16	2311	ERS1456853	SAMEA4557674
389/16	2312	ERS1456854	SAMEA4557675
390/16	2313	ERS1456855	SAMEA4557676
391/16	2314	ERS1456856	SAMEA4557677
392/16	2315	ERS1456857	SAMEA4557678
673/15	2357	ERS1456858	SAMEA4557679
652/15	1295	ERS1456859	SAMEA4557680
654/15	1297	ERS1456860	SAMEA4557681
655/15	1298	ERS1456861	SAMEA4557682
656/15	1299	ERS1456862	SAMEA4557683
659/15	1300	ERS1456863	SAMEA4557684
660/15	1301	ERS1456864	SAMEA4557685
661/15	1302	ERS1456865	SAMEA4557686
663/15	1304	ERS1456866	SAMEA4557687
667/15	1305	ERS1456867	SAMEA4557688
668/15	1306	ERS1456868	SAMEA4557689
674/15	1307	ERS1456869	SAMEA4557690
675/15	1308	ERS1456870	SAMEA4557691
676/15	1309	ERS1456871	SAMEA4557692
677/15	1310	ERS1456872	SAMEA4557693
678/15	1311	ERS1456873	SAMEA4557694
679/15	1312	ERS1456874	SAMEA4557695
680/15	1313	ERS1456875	SAMEA4557696
681/15	1314	ERS1456876	SAMEA4557697
682/15	1315	ERS1456877	SAMEA4557698
683/15	1316	ERS1456878	SAMEA4557699
684/15	1317	ERS1456879	SAMEA4557700
666/15	1318	ERS1456880	SAMEA4557701
657/15	1319	ERS1456881	SAMEA4557702
658/15	1320	ERS1456882	SAMEA4557703
665/15	1322	ERS1456883	SAMEA4557704
669/15	1323	ERS1456884	SAMEA4557705
670/15	1324	ERS1456885	SAMEA4557706
671/15	1325	ERS1456886	SAMEA4557707
672/15	1326	ERS1456887	SAMEA4557708
653/15	1332	ERS1456888	SAMEA4557709

Sequenzen der drei *de novo* assemblierten Plasmide des Ausbruchsisolats 652/15

>3,559 kb-Plasmid

TCAACAACAACAAATGCTCGACCCAAAACCTTTAAACAAATCCGGATCTCTTAAATCATTTAGCTCTAACTTATT
ATAATCAGAAACATCATAACGAACACCGAGATCAATGCTATCATTAGTAATATAATAATCTTCACTATCGCAGT
GGTTAATGTATTTTCACTAATCACCTGACTCAACGAATTTATCAATCCATCGATAAGGTTCTTTGCATGTTTT
TTGGTTAGAGCTATGGAATAAAAAACCCCTTCCTGATTCTTTTTCAGGAAAGTCCACTAACTCTAAAAACAAT
ATCTTCAGCTATCCCAACTCTTAGAGCCATCGGGAATACAGGTTTCATTTTTCTTGGTGTTACTTTCTTTCTAA
AGAATCTTTATTGCTCATTATAATACCCGATAGAAATAAATTTAAGTTTAGAACATAAAAAATAATACCATAA
AACAAACATCTTTTATCCACAATGCTCATTTAACATTACATTGGTTCACCTTATGGAATTTGTGGCCATGATTTAA
CATAACACCAAAATTTGTACGCACCGCTAAAACGGCCTCAGGGCGTTTCTGACGGGAAACCGGTAAAAACAGGC
AACAAACACCCGAAAACCCGCCAGAAACGCGCAGGCTCTGTTTTTACGGCATGCATGAGTATGCACGCAAGT
GCATAGCGCGAAAATTCACGCCATTCAGCCAGGGTAAGTCTGTTTCCGGCGTTCTTCCCATCCGAAAACGGTG
AACGGGGACGCAATTTATTGCGTGGCCGTGAAGCGTTGCCGGCGCAGCCGAAAAACCGGTTTTTCAGCACGTTT
AGGAATCGGGTTCGTCGACGGCCGGCAATCACGTTATGGCAAGTCGCCGGACGACTCACCACACGATTCACCG
GCGACTCTTCACTAGAGTCGTACCCAGAGTCGTACGCTAAAAACAACCAAACGGGGAGTCGGGTCTAGAG
TCGGGTCTGTTTAACTTATTGTTTTATAGTCTGAGTCGTTACCGACTCTATGACGACTCGCCGGGACTCTA
TGACGAGTCGTATAGAGTCGGATCTGTATAAATAAAATTAACGAAATTTATAGAACGTAAACTACTG
ATATAAATAACAAATCTGCAAAATTTTAATTTTGCCTGGGGTGTGGATATTTTTAGTGGTGAGGAGCGTTTCA
GATCTGGCGATTTTTGGGAAGGTTTCAGGAACTCCCGGAATGGCCGGAGAGGAAAACCTGAAGCATGACGGGG
TCAGGATTTCTTCCAGAATTTCCACCACGGAGAATGAACCTGTGGAGAGGGTTCGAGCTTGTGTTCCAGAAGCT
GCATAGCCTGGCGAAGAGAATCGATATGTTTCATCACGAGCTTTAACAGCCCCCTTAAGACCATCGTTTTTCAGCT
TCAAGCAAAGCAATTTATGCTGTAAATCATGTAAACCAGAGATGTTAACCCCTGTAGCGCCTGCGTCACCTTT
TACATCATGTTTTACAGTGTGCCCCCACCATAAAGCGAGCCAAACCCCTAATAAGCTCTGATGATCAACA
ACTTTAGTATTTTCCCATGCTTTACAACAGAGGTGTAACCTAGTTTCCCACTGTTAATCATCTTGTAAATTGTG
GGGCGACTAACCTTAACAAGCCGAGCCGCTTCACTAATAGACACTCTGGCCATCAGTTTCCATCCTGTAATTCA
TCCAGTCCCGAAGACAGTGTACGGAAAAGATGCTCCGCATCATCGTGGAGTTTCTCACAAGGTTCGGCCTCTA
CATCAAGATCAAGCTCGTTAAGCTTCTCCAGCAGGAGCAGAGACTGATTCTGGATGAATTTAGCCATGTTTCAGC
GCTGTTTTCTGTTGTTTCGTCATAAGAGGCCTCAGAGCGTCAGTGCTCAGTGTAGGGATGTTCTCTTTCCGCTT
CCTCGCTCACTCAGTCGCTACGCTCCTGCCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGCAGGAGCATCGTATAAAAGCTCG
AGAAAACCGAGCATCGCGTGATGGGGAGAAGGAGAGGCCGCACAGCGGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCC
CCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCA
GGCGTTTCCCCCTGGTGGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCTGCTTTCCGTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTT
ATGGCCGCGTTTATCTCATTCCACGCCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACTGTATG
CACGAACCCCCCGTTTCAGTCCGACTGCTGCGCCTTTCCGGTAACCTATCAACTTGAGTCCAACCCGGAAAGACA
CGACGAAGCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACCTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTTATGTGCCAGTTA
AGGCTAAACTGAAAGAACGATTTTGGTTACTGCGCTCCTCTAACTAGCCAGTTACCTTGGTTTCATAGAGCCGCA
AACTCTTAGAACCTAAGAAAAACCGCCCCGCAAGGCGGTTTTCTTTTTCAAGAAGAGTACTAGGTCACACTT
GATGAGCTCAAGACGGTTTTTCGCTAAAGAGGAACAACCCAGCCACCTTCATTTCTTTGAAAAAAGAGGATAA
TTCCAAAATAGTTGTAGTCACCTCAATCAAAGTAAATTCATCATTAATATCAAATAAATACCACAAACCCAAGT
GAGGGTAACCTTCGTCCTTTATATCAATACATTTATCTGGTTTGTAACTTGCTCGATCACTTCCGCTGCATCAA
ATGAGAGATATATGGCAGGTTTGGTTTTCCCTACAGGGATTCTTTATGTACATCCCTTACCATTCCCTCATAAT
AATCTTTATTTGAATGATAAATAGACACATAATCCTCTGAAATTTCCCTCCCTAAGATAAAAAACACTTAATAGTT
GTAGCGCCAACTCATCTTTATGATCTTCCATAACATAACGCCATAAATATGAATTATTTGCTCTGCCCGTAAA
TGCAATTAACAAGGATTGATTGTAGGTTATTTAAAGTTGATAACACAGTCATCACCACCTCATTTTAA
TAATGATTTGATAGGATTGAGTTATCAAGGCTATCGCCAATATATGCCCTACCTGAACCTTAACCACTCCAG
AACTTTTCTAACAAGGAAAAAATAATCTCGTTATTTGTTTTCACTATTAAATTTAGCGTGCCTTTGCTTTTCT
TAGTTTGTATATATAAGCCCAAAACACTCTGATTTTTATCAAAGTAAATCTGAGCGTCTTTTTTTGCAGCAA
GTTTCAGGGGCATACCTAATCAACTGAACAATAGCCTGCAAAGATGGTTCTAGGTACACAGTGCAGAACTCGTA
TTCTCTATTATAAACAGAAATGGCACTTCTTATTTTTTAAAAACAATAAGAATTCACCTGATAATTCTAATG
ATTCGTAATGTTTTAAAATTGACTCATAACCGTCACCAGAGCAATCTAATGTTTTAACATCATCTTCCAAGAC
TCCCAAACAGAATTC

>4,160 kb-Plasmid

AACGACAGCACACCGGAGGTGTACTTTTTTCGCATACGGCGAGGCATCGATAAGCTCCCGGACTTCTCCGGCT
TTCCCTGCAGCACGGTCGCCCCCTCGCGTGCCGGTCTTTTCCAGCAGGTAATCCACCGGACCGGCACCACCA
CCAGCCCCCGGGGATGGAATTTAACGATCATCTCCCCCTGTTTCCAGCACCGCATGCCGACGGCTCCCA
GTCCCGCTCGATTGCCATCAGGGCGGCCATGATCCACCCGATCATGGCCGGCACCCAGGCATTCATTTT
CGGGCGATCTGGTTACAGTTGTTACCCATACCGGCAAGCTGGCGCAGCAGCGCAGGCGATATCGAAGGCAGTC
TGCCGGCACGTGCCGGCTTCTCATCCAGGCAGGTCTGACGCATCCACGCCGCGAGCTGCCTGCCGTCGACCCG
TCGAGCAGCCCGCGTGTTCGTCTCCGTCACCCACATCGTGAGCATCTTGTGCGTTTATCTGCCACAGTAGC
CTCCTGATAACACCGGGACGGGCGGGAATTTTTCCCGGGCGGCACGGTGTGGACAAGCCGACGGCGCGTCA

GTCGCTTTTAGCGGGTTTCGGGGCGCAGCCCTGAACCAGTCACGTAGCGCTAGCGGAGTGTATACTGGCTTAA
GGTATAGTGCAGTATGTCAGATTCAATGCGGACTGACTGCAAAAAAGCGGCCCTGCTAGAGAGGGCTGTTATC
TGATATAGGCTTTGTTTAGTGCCACGCGTTGAAGTGAAGGAAATGGGAGGGTGGTCGATGATTCAGTTCTGTT
AGAATCAAGAGTCACAGTACGCAATGGTGAATAAGTAAATGTTAAATGAACATAAAAAAGCACAATTTTAGTA
TATACATACTATTAGCTGTTGGAAGTCCGCTGACGGAAGTATATGGGGTGATTTTAATTATAAAGCGCTGCC
TATAACATAGGTAGAGCTTTAGTTTGGCCATTTCATATGGTTCCCAACGCTAGGAGCGATTGTTGGTGGGATACT
ACTTCTTATTTTATAGCTTATGTTTCATTAAAGAAATAGGAAAAAGGCTGCATTAGCAGCCTTTTCTATCGG
CAACTTTCAATTGACACTTTTCATTGCTGAAATCAAGTTATCTGCCCCCTCTCTATAAATCCTCGATTCCTACTT
TCCGGGTACCATATGTATCTTTTATTTTATCATATGCACAAGAACAGACTTTATGAGCGTAATCACTCGTACTC
CCCCAGTGAACCATCCATAAATCTGACTTATTCTTATCGCCGCATGAAGTGATCAGTAACAAAGATGAAAT
TAAATTTATTAACCGCATTAACACCCCTTCCTTTTTTATTCCTAAAGTAAGTTCGTCGACTCACACCAAGTTCA
ATCCATGGCTCACCTAACTAGGTCTTCCACCTGAATTACTTTTTTCCACCTATAGCCCCCTTTTCTACCTC
TTATTCTCTGTATATCAGAGGTATGAGTACGTATAACATATTTCATCAAAAAGCTTCTTTACTAAAATTAGAGCCA
GTCCATTTAGCAATACTTTTAGCAATCCCCATTACTTCTTTATCGTCAAGAGGCGCTGAAAATTGAAGGTTATA
AGCACTGGCGCGTTCGTAGCAGGCTTTCAGCCACTGTTTCATACTCAGGCCAACCTGACGATGGCGCGGTAT
GCCCCTTCCGGGTCTTGTGCAACAAGGTGCAGTTACGGCCTAAGCCGTAGTCAGCAATGATTTCTTTGTCAAT
CGCGGCGTTTAGTTCGAGAAAATCAGCAAGCCAGTCCAGCGTGTAGAGTTCCGGCTGCCACACAGCAATTTTC
CAGTGGGCATGGTTCGGATTTTTCAGATTAGTCCCGAATTAGCCCGCGTCCGCTCTAATTTTTACGTAGCGC
GTTCTCCACGGCGCGGCATAACGCAGCGGTTTAAATTTACCATCCGGCGCAGTGGCGATTGAGGTTTAGTG
CGTACAGCAGGTGCGCATGTCCGTTGTGAGGATTAGTGATGGTCAGCGTAGGCGCTGGAGCATTACGATCACT
CCAATCAATGGCAGCACCGGCGCGATCGACGTGCAATCCAGCCAGAACATGGCGTGAGGCTGATTGAACGG
ATGTATTTCCGCGAATGGCGCGTCTTTACCGGCAATTCGTACACCAAAGTGCAATCGTCCGAAAAGTACG
GCTTATGCGGCAACGCTCATTTGAAAAGATGGAGTGCAGCGTTACTCAATCCGGCCTGCGCTTATGGCGGGCT
GTTGTCTGGCACGGTTCATGTGCTAAGATTCTTCAAGGTTTCGTACCTGGCCCTGGTTATCATGTGCATCCGCC
AAGATTGAGCATGATTTCGGGGCTTCGTTTTTCTGTCTTAACGTTACACCGTCTGGCAACTTCTGTGCAACC
ACAACAATTTACCATAACATCCGTTGCCCGCACCGTGAACCGGGGTTGGTGGCTGCGTTCCGGTGCCAGACG
GAGAAAAGTGGCAACAGACATGACGAAAAAACACCAAAAAACGCAGCCGCTGGATATTACACTGTTGCATGGTC
ATGCAGCCAGATGCATACGGTCTGATTTACAGGCCAGAATCCGGATGAACGCCTTAAAAACAGGAAAATGCTTC
TCCAGCCAGTCCAGATCTCCAGCGCCATGTACAGGCAGTTCAGCACCGTCTCAATCACGTTAAACAGTCTCAT
AATCCCTCCGTTGTATACGCCGTGATGTTTTATCACGACCGTATTTAGCGGGAATTTATGAGCCCTTCTTCGT
GGGGGTTGTCACTGGTGAAGCTCTGTGAGCCAGCGTCGGACCGTTATAGCTCCGCTGACGGGAACGGGCTTC
CGCCAGCGCTTTTTCGTGCTGTGCTGCTCGTATGCCCGTTCCGGCGCCACCGCCATTTTCATGCCGCTGCACTAC
TGGCTCAAACGCTGTAAGTGCCTGCTCAAGTTGCCACCTGCTGACTCAAGCGCGTCACGCGCTCGTTCAAGTG
CGCGTTCTCCCGTTGCATAAGCCCAGACATCTTCTGCCATTCCGCGAAGGCGCTCTCCCACTCGTCCAGCCTTT
GCGAGTAGTCTGTAGTGCTCTAATGCGGTCAGCAACTGTTTTTCCAGTTCCGTCATGGGCTATTTCTCTCT
CCAGTACCATCCAGTTCCCGTCTCTCCCGTAAGCTCCCGCTTTCGGGTTCACTTTGACGCAGGACAGTTTCTTCT
CCCCGCAGAGCGACAGCTGCACGCCGTGGTTCTTCTCCGACAGCATGGCCTGCGTCCGCTCCTGCGCCCGGATA
GTCTGGTAATTCCCGGTGATCTGCTGCCCTGCCACCACAGAATGCTCCCGCTCGTGGCGATCAGCAGTACCGA
GACCAGGGTGATGGTCAGCCACGTCCGGCCGACCATACGCAGCACGCTCAGGCGGTTTCGACTGCATCGCCGCG
GTCATAGCCCTGCTCGTGGGCGCTGATGGCGTCTGATTTCTTTCGCGCTTGCGCTCAGTTCCGCTTTTACAGAC
TTCTCGTGCTCGCTGAATGCGGCTTTACAGCATCTCGCCGTAATCTGCTGCTGCGCTTTCGATTTCAGTTCCGCAAG
TCCTTCGCCAGCGCTAAAAGACTGCTCATAAATGGCTCCCTTCAGTCGGATGTTTCGCCCCCGTCCGGGTCGG
CAATGCTGATACTGTTTTTGTGGTGGGACCACCTCAAACCTGCCGCTGTGAGCGCCCCCTGTGACGTCTCTCG
CGCGTTTTTAGCTCCCGGATGAGGCTAAGGCCAGCAACCCCGTGTAAATCGCCTGAGCGGCTTCCATCTTCGT
TTCCGGCAGTGCGGACGGCGTGACCAGTAACCGCCGTTCTCAGGGGCGTTTGGATCATGCAGCCCCAGTCTG
CCGTTACACCGGTCTGCCAGGCATCGATGCGCGGCCGGTCCGGCGGATCGTAGTACGGCTGCAGGCGTTTCC
CGGTACAGCAGTTCAGTGTGGGGATCAGGAAATTCAGTCCAGCCGCCCTTGTGCGTGTGCTCCACCCACAG
AATGCTGTACTGGTCTTTATCGAGCCCGGCATCAGAACCCGCTCAAAGCTGGCCATGATCTGCTCCCGCTGCC
CGGGCGGCAGTTCAGCCTCCGCG

>3,223 kb-Plasmid

ATATTTTCTGGGAGGGGCTATTGTGGCTGAAGTCATAGGCACCATCTTTATGAAATATTCAGAAGGATTTACA
CGCCTGTGGCCGTCTGTAGGAACTGCAATAAGTTATTGCGCTGCCTTTTATCTGCTTTCCCAAACATTGGAAAA
TATACCTACCGGTATTGCTTACGCAATTTGGTCTGGTGCGGGAATTGTACTAATAAGCCTAGCTGGTTGGTTGG
TTAGCGGTCAAAAATTTGATTGGCCCGCAATTGCAGGAATGTTCTTATTTGCGTTGGAGTTTTGGTTATTAAT
ATTTTTTCAAATCTTCTGCGCATTAACCTTTTACCGAAGCATATTGGCCAAAGCAAAGGATTTCTTGAGAT
CCTTTCTTCTGCGCGTAATCTTTTCCCTGTAAACAAAAAACACCGCTACCAACGGTGTTTCGTTTGCCGGA
ATTACAGAGCTACCAACTCTTTGTTCCGATGGTAAGTGGCTTTACGGAGCGCAGATACCTAAACTGTCTTTCA
GTGTAGCCGCACTCAGGCTTTCACTTCAAGAACTGTAGGCATTCTCTACAATCTCTGCTCCGTGAACCCAGT
TACCAATGCTACCGCATGGCGATTGTCGCTGCTTTCCGGTTGGACTCAAGTTGATAGTTACCGGAACCG
GCGTGGTAGTCGGACTGAACGGGGGGTTTCGTGCATACAGTCCATCCTGGAGCGAACTGCCTACCCGGAACCGA
GTTTCAGGCGTGGAATGAGAAACCGCGGCCATAACAGCGGAATGACACCGGTAAACCGAAAGGCAGGAATGC
GGGGGAGCACGAGGGAGCCACAGGGGGAACGCCTGGTATCTTTAAGCCGCATCGGGTTTCGCCACCGCTG
ATTTGAGCGTCATTTTCTGTGATACTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGGCAACTCCGCATCCTTTT

TTGGCCTTTCCTGCTTCGAGCGGCATTTGCTTATCCCGTAATCTGTGAGCTGGTAACGCCCGCCGCAGTCTCAC
GGCAGGAGCGTAGCGACCGAGTGAGCGAGGAGGCGTCATTTTCATCACCACTGCATTTTGCACCTACGCCCCG
CAGCCGCATTTTCCCCTGTCACATGAAGCACTTTCATAAATTGCCACTCCGTCATAACATGTTTAGCCAGTATA
CACTCCGCTAGCGCTACGTGACTGGTTCAGGGGTGCGCCCCGAAACCCGCTAAAACCACTGCCGCGCCTGCGG
CTTGTCACACACCGTGCCGACCGGGAAAAGATTTCCCGTCCGTCCCGGCGTTATCAGGAGGCCGGATTGGCAG
ACAAACGCAGCAAAATGCTCACCATGTGGGTGACTGAGGACGAGCACCGGCGTCTGCTGGAGCGCTGCGAGG
GTAAGCAACTCGCGGCCTGGATGCGGCAGACGTGCCTGGACGAGAAGCCCGCACGCGCCGGCAAACCTTCCGT
GATCTCGCCGGCGCTGCTTCGTGAGCTTGCCGGCATGGGGAACAACCTTAACCAGATTGCCCGCCAGGTAAAC
GCCGGTGGTGGAAGCGGACACGACCGCGTGACAGATTGTGCGCCGCGTGATGGCCATCGATGCCGGACTCGAGC
GGTTGCGGCATGCCGTACTGGAAGGGGTGCTGATGATGATCGTTAAGTTTCATCCTCGGGGGCGCGGCGGCG
GCGGCGGGCCGGTTCGATTATCTGCTGGGTAAAGATCGCCAGCGCGACGGCGCCAGCGTTCTGCAAGGGGAAGCC
GGATGAAGTCCGGGAGCTTATCGACGCCTCGCCCTACGCCAAAAAGTACACTTCCGGCGTTCTGTCTTTGCGG
AACAGGATTTACCGCCCGGCCAGCGCGAAAAAGCTGATGGCGAGTTTCGAGCGGGTTCTGATGCCCGGACTCGA
TAAAGACCAGTACAGCGTGCTGTGGGTTGAGCACCGGGACAAGGGGCGGCTGGAGCTGAACTTCTGATCCCCG
AACACGGAGCTTCTGACCGGAAGCGGCTACAGCCGTATTACGACCGCGCCGACCGTCCGCGCATCGATGCCT
GGCAGACCATAGTGAACGGCAGGCTGGGGCTGCATGACCCGAACGCGCCGGAGAACCAGCGGGGTGCTGGTCT
CGCCTTCCGCGCTGCCGGAAGCGAAGCAGGAAGCCGCCAGGCGATTACGAGCGGCCTGCTTGCCCTTGCCCTC
ATCCGGGGAGCTGAAAACGCGTCAGGACGTCACTGAGGCGCTGGAAGCGCAGGTTTTGAGGTGGTGCGCAC
CACAAAAAGCAGCATCAGCATTGCCGACCCGGACGGGGGGCGAAACATCCGACTGAAGGGAGCCATCTATGA
ACAGTCTTTTAACGCTGGCGAAGGACTTAGAGCAGAAATCGAAAGCGCAGCAGCAGACTACCGGCGAGATGC
TGAAAGCCGCATTCAGCGAGCACGAGAAGTCTGTCAGAGCGGAACTGAGCGAAAGCGAGAAGAGAATCAGCG
CCGCCATCCTCGACCACGACCGGAAGCTGTCCTCAGCCATGAGCCAGCGCACGAAAGGGATGCTGCGCATGGT
CAGCCAGACGTGGCTGACCATCGTTCTGGTCTCCGCGCTGCTGATAGCGTCGAGCGCGGGCATTCTGTGGTGGC
AGGGGCAGCAGATACTCGAGAACTATACGACCATCCGGGAGCAGAAGAGCACGCAGGCCATGCTGTCAGAGA
GGAACAGCGGCGTACAGCTCTCGACCTGCGGCGAGCAGAGACGCCGCTGCGTGAGGGTGAACCCGGAAGCGG
GACAGTTTCGGAGAGGACTCGAGCTGGATGATACTGGCGGGGAAATAGCACATGACGGAGCTGGAAAAACAGT
TGCTGAGCGCATTAGAGCAGCTACAGCAGGACTACTCGAAAAGGCTGGACGAGTGGAAGAACGCCTTCGCGG
AATGGCGGACGATGTCTGGTCTTATTCAACGGGAGAACGCGGCGCTGAACGAGCGCGTCACGGTCTTGAGCAG
GCAGGTGCAGAGTTTGAGCGAGCAGCTGCGCCGTTGTGCGAAAGGCTGAACGCGATAGAACTCACCGGCAG
CAGGAGCGGGCGGTGCAGCACCAGAAAGCGCTGGAGCTGGAACGATCGCAGTGGCAGCATCATGGTCCTTCG
CTATGATAAGCCGGTTCTATTAATTAGTTGTTATGTAAAGATATTTAAATTTTCAACATGAGGTATTTTTATG
AATACAT

Abkürzung	Bedeutung
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp, kb, Mb	Basenpaare, Kilobasenpaare, Megabasenpaare
CG	Klonale Gruppe (<i>clonal group</i>)
<i>cps</i>	<i>capsular polysaccharide synthesis</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ENA	<i>European Nucleotide Archive</i>
ESBL	<i>Extended-Spectrum-Beta-Laktamase</i>
Gb	Gigabyte
GCG	Galle-Chrysoidin-Glycerol
Inc	Inkompatibilität (<i>incompatibility</i>)
IS	Insertionssequenz
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MH	Mueller-Hinton
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MRGN	Multiresistente gramnegative Erreger
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDM	New Delhi Metallo-Beta-Laktamase
<i>NGS</i>	<i>Next-Generation-Sequencing</i>
NRZ	Nationales Referenzzentrum
OXA	Oxacillinase
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PBRT	<i>PCR-based replicon typing</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
s, min, h	Sekunde(n), Minute(n), Stunde(n)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
ST	Sequenztyp

Abbildung 1 Vergleich der Strukturformeln von Penicillin und D-Alanyl-D-Alanin, dem eigentlichen Substrat der Penicillin-bindenden-Proteine	6
Abbildung 2 Prozentualer Anteil invasiver <i>K. pneumoniae</i> -Isolate mit Resistenz gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation bzw. Carbapenemen im Jahr 2015 im europäischen Vergleich	12
Abbildung 3 Häufigkeit der Carbapenemasen OXA-48, KPC-2, KPC-3 und NDM-1	12
Abbildung 4 Gelelektrophorese der mit Restriktionsenzymen verdauten Plasmid-DNA des Isolats 234/12	48
Abbildung 5 Puls-Feld-Gelelektrophorese extrahierter DNA.....	53
Abbildung 6 Einfluss des Extraktionskits auf <i>Read</i> - und <i>Insert</i> -Länge	54
Abbildung 7 Einfluss des DNA-Extraktionskits auf die Qualitätswerte Q20 und Q30.....	54
Abbildung 8 Einfluss des DNA-Extraktionskits auf die <i>Coverage</i> von Chromosom und Plasmiden ..	55
Abbildung 9 <i>Coverage</i> entlang der Replikons.....	56
Abbildung 10 Kopiezahl der Plasmide bestimmt über qPCR	57
Abbildung 11 Herkunft der sequenzierten Carbapenemase-produzierenden Isolate.....	59
Abbildung 12 Verteilung der Sequenztypen in Abhängigkeit der produzierten Carbapenemase.....	60
Abbildung 13 Virulenzgene in den Carbapenemase-produzierenden Isolaten.....	62
Abbildung 14 Über PlasmidFinder identifizierte Plasmid-Replikons in den Carbapenemase-produzierenden Isolaten	65
Abbildung 15 Phylogenie der Carbapenemase-produzierenden <i>K. pneumoniae</i> -Isolate in Deutschland	67
Abbildung 16 Detailansicht ST258 und ST512 – Carbapenemase-produzierende Isolate	68
Abbildung 17 Phylogenie der Carbapenemase-produzierenden Isolate aus Deutschland und der internationalen <i>K. pneumoniae</i> -Isolate	70
Abbildung 18 Detailansicht der Cluster ST258/ST512 – Internationale Isolate	71
Abbildung 19 Phylogenie der im Rahmen der Ausbruchsanalyse sequenzierten <i>Klebsiella</i> -Isolate....	74
Abbildung 20 Gel-Elektrophorese der Produkte der Cluster 1-spezifischen Multiplex-PCR	76
Abbildung 21 Schematische Darstellung der Region <i>upstream</i> des <i>bla</i> _{CTX-M-15} -Gens.....	80

Tabelle 1 Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Sequenziertechnologien	14
Tabelle 2 Erstmals identifizierte Allele bzw. Allelkombinationen.....	42
Tabelle 3 Eigenschaften von Chromosom und Plasmiden des Isolats 234/12.....	48
Tabelle 4 Mittels ResFinder identifizierte Antibiotika-Resistenzgene im 362 kb-Plasmid.....	49
Tabelle 5 Mittels PlasmidFinder identifizierte <i>rep</i> -Gene im 362 kb-Plasmid	50
Tabelle 6 Eigenschaften der DNA-Extraktionskits	52
Tabelle 7 Nachgewiesene Beta-Laktamase-Gene in den Carbapenemase-produzierenden Isolaten	61
Tabelle 8 Im ST23-Isolat (316/15) identifizierte Virulenzgene	63
Tabelle 9 Identifizierte <i>wzi</i> -Allele	64
Tabelle 10 Über PlasmidFinder identifizierte Plasmidreplikons in den Ausbruchsisolaten	79
Tabelle 11 Internationale Verbreitung der in Deutschland identifizierten <i>K. pneumoniae</i> -Sequenztypen	89

An dieser Stelle möchte ich allen, die in den letzten Jahren auf vielfältige Art und Weise zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben, meinen Dank aussprechen.

Mein Dank gilt in besonderer Weise meinem Mentor Prof. Dr. Ulrich Nübel für die ausgezeichnete wissenschaftliche Begleitung meiner Arbeit, die stetige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Anregungen.

Prof. Dr. Michael Steinert und Prof. Dr. André Fleißner danke ich für die Bereitschaft, meine Promotion als Teil der Prüfungskommission zu begleiten.

Prof. Dr. Guido Werner danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können, das in mich gesetzte Vertrauen sowie die hervorragende Förderung und fachliche Betreuung in den letzten Jahren.

Dr. Yvonne Pfeifer und Dr. Stephan Fuchs danke ich ganz herzlich für ihre ausgesprochene Hilfsbereitschaft und kollegiale Unterstützung.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachgebiets 13, insbesondere Sibylle Müller-Bertling und Kirstin Ganske und allen Doktoranden am Robert Koch-Institut Wernigerode für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Ich danke Dr. Matthias Steglich, Dr. Christoph Eller und Dr. Mohamed Abdelbary für die Bereitschaft, ihr Wissen mit mir zu teilen. Bernd Neumann und Michael Pietsch danke ich ganz besonders für ihre Unterstützung und die unzähligen lustigen Momente.

Meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern, meinem Mann Daniel und meinem Sohn Philipp, danke ich von Herzen für ihre Liebe, Geduld und tatkräftige Unterstützung.